

Thesis

GIESSEN

1966

Aus dem Institut für Virologie
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Direktor: Professor Dr. R. Rott

Enzymatische und nicht-enzymatische Veränderung der Erythrozyten-Oberfläche durch Newcastle disease Virus

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von
Mohamed Sami Saber
Tierarzt aus Kairo / V. A. R.

Gießen 1966

LANE MEDICAL LIBRARY OF
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR
PALO ALTO, CALIFORNIA



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153519_0031

Aus dem Institut für Virologie
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Direktor: Professor Dr. R. Rott

Enzymatische und nicht-enzymatische
Veränderung der Erythrozyten-Oberfläche
durch Newcastle disease Virus

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von
Mohamed Sami Saber
Tierarzt aus Kairo / V. A. R.

Gießen 1966

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät

in Gießen

Dekan: Prof. Dr. H. Bartels

Berichterstatter: Prof. Dr. R. Rott

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Juli 1966

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung und Problemstellung	1
II. Das Newcastle disease Virus	3
III. Blutgruppenspezifische Eigenschaften der Erythrozyten-Oberfläche	5
IV. Material und Methoden	7
V. Untersuchungsergebnisse	14
A. Neuraminidase-bedingte Veränderungen an der Erythrozyten-Oberfläche	14
1. Freilegung von ABH-Blutgruppen determinierenden Kohlenhydraten an Erythrozyten-Oberflächen	14
a) Abspaltung von Sialinsäure aus Erythrozyten des Menschen und des Huhnes	14
b) Freisetzung von blutgruppenspezifischen Kohlenhydraten von Erythrozyten des Menschen	16
c) Veränderung der blutgruppenspezifischen Eigenschaften von Tier-Erythrozyten	22
d) Reaktion NDV-behandelter Erythrozyten mit blutgruppenspezifischen Antiseren	25
e) Freilegung von Blutgruppen-determinierenden Kohlenhydraten an Erythrozyten von Neugeborenen	28
2. Freilegung eines Forssman-Antigens an der Oberfläche von Hühner-Erythrozyten	30
3. Reaktion von nativen und Neuraminidase-behandelten Erythrozyten mit Normalseren von Mensch und Tier	35

	Seite
B. Nicht enzymatisch bedingte Veränderungen an der Erythrozyten-Oberfläche nach NDV-Behandlung	39
1. Nachweis von Forssman-Antigen im NDV	39
2. Übertragung eines Forssman-Antigens vom NDV auf Hühner-Erythrozyten	41
3. Auftreten eines Mononukleose-Antigens an der Oberfläche NDV-behandelter Erythrozyten	43
4. Wirtsspezifische Komponente als Träger des Mononukleose-Antigens im NDV	46
VI. Besprechung der Ergebnisse	49
VII. Zusammenfassung	55
VIII. Literaturverzeichnis	56

Lebenslauf

I. Einleitung und Problemstellung

Das Newcastle disease Virus (NDV) wird mit einer Reihe anderer lipidhaltiger RNS-Viren in der Gruppe der Myxoviren zusammengefaßt (Andrewes et al., 1955). Die Myxoviren sind dadurch charakterisiert, daß sie eine spezifische Affinität zu bestimmten Mucoproteiden besitzen und als integrierenden Bestandteil ein Enzym enthalten, das die ketosidische Bindung zwischen Acylderivaten der Neuraminsäure (Sialinsäure) und anderer Zucker hydrolysiert und als Neuraminidase (Sialidase) bezeichnet wird (Gottschalk, 1959). Die Neuraminidase, deren Bildung durch das genetische Material der Myxoviren induziert wird (Rott und Scholtissek, 1964), ist ein integrierender Bestandteil der intakten Viruspartikel.

Die besondere Affinität der Myxoviren zu Mucoproteiden findet ihren sichtbaren Ausdruck in der sogenannten Hämagglutination. Werden nämlich Myxoviren mit Erythrozyten unter geeigneten Bedingungen gemischt, so werden diese verklumpt. Die Viren gehen dabei eine feste Bindung mit spezifischen Zell-Rezeptoren ein, deren wesentlicher Bestandteil, die Sialinsäure, an Mucoide oder Glycolipoide gebunden ist. Wird der Virus-Erythrozyten-Komplex bei 37° C bebrütet, so wird durch die Einwirkung der Neuraminidase Sialinsäure abgespalten und somit der Zell-Rezeptor zerstört. Die so behandelten Erythrozyten können zumindest durch das homologe Virus nicht mehr agglutiniert werden. Die Hämagglutination der Myxoviren beruht daher offensichtlich auf einer Enzym-Substrat-Bindung (vergl. Anderson, 1959).

Neben den Myxoviren enthalten auch verschiedene Mikroorganismen Neuraminidase, so u.a. *Vibrio cholerae* und *Clostridium perfringens* (vergl. Burnet, 1960). Wie das Virus-Enzym ist die Bakterien-Neuraminidase in der Lage, den

Myxovirus-Rezeptor an der Erythrozyten-Oberfläche zu zerstören. Daneben wird durch Neuraminidase-Behandlung die negative elektrische Ladung der Erythrozyten herabgesetzt. Weiterhin werden infolge der Neuraminidase-Einwirkung an der Erythrozyten-Oberfläche neue Antigene, die sogenannten T-Agglutinogene frei, die für das Auftreten einer Panagglutinabilität (Thomsen-Friedenreich'sches Phänomen) verantwortlich gemacht werden. Das Wesen dieser, zwischen einem T-Agglutinin, das in allen Menschen- und einigen Tierseren vorkommt, und dem T-Agglutino-gen ablaufenden Reaktion ist noch nicht völlig aufgeklärt. Über die chemische Natur des T-Agglutino-gen-Rezeptors ist nichts Sicheres bekannt. Darüber hinaus zerstört die Neuraminidase MNSs- Blutgruppenrezeptoren an Menschen-Erythrozyten, ebenso die Lu(a)- und Lu(b)-Rezeptoren des Lutheran-Systems sowie den Mononucleose-Rezeptor an Schaf-Erythrozyten. Schließlich werden Neuraminidase-behandelte Erythrozyten durch inkomplette Agglutinine des Rh-Systems im NaCl-Milieu agglutiniert (vergl. Uhlenbruck, 1961).

Neben diesen auf der Einwirkung der Neuraminidase beruhenden Veränderungen, wurden nach Behandlung der Blutzellen mit ND- oder Mumps-Viren charakteristische Phänomene beobachtet, die sich mit anderen Myxoviren oder Bakterien-Neuraminidase nicht erzeugen lassen. So können Erythrozyten, die bei 37° C mit NDV behandelt wurden (NDV-behandelte Erythrozyten), durch NDV-spezifisches Antiserum und eine Reihe von Seren von Menschen agglutiniert werden, die an infektiöser Mononucleose erkrankt waren. NDV-behandelte Erythrozyten agglutinieren weiterhin nicht-vorbehandelte Blutzellen und zerstören hämagglutinations-inhibierende Mucoide durch Sialinsäure-Abspaltung. Diese von Burnet und seiner Schule (vergl. Anderson, 1959) erhobenen Befunde deuten darauf hin, daß ein Teil der Viruspartikel irreversibel an die Zelloberfläche gebunden ist. Diese Ansicht läßt sich durch 2 weitere Beobachtungen stützen: 1. Die beschriebenen Reaktionen werden ver-

hindert, wenn die Virus-Rezeptoren der Erythrozyten-Oberfläche vor der Virusbehandlung mit Vibrio cholerae-Neuraminidase (RDE) zerstört werden. 2. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen lassen sich nach der Virusbehandlung auf der Erythrozyten-Oberfläche typische Viruspartikel feststellen.

Auf Grund dieser Befunde scheinen bei der Wechselwirkung des NDV mit Erythrozyten zumindest 2 unterschiedliche Reaktionen abzulaufen. Die eine entspricht der auch bei Influenzaviren festgestellten Hämagglutination und Elution. Die zweite führt zur irreversiblen Bindung von NDV bzw. einer Virus-Komponente an die Erythrozyten-Oberfläche. Es ist denkbar, daß bei den beiden unterschiedlichen Reaktionen verschiedene Zell-Rezeptoren beteiligt sind.

In der folgenden Arbeit wurde versucht, weitere Aufschlüsse über die nach Behandlung mit NDV an der Erythrozyten-Oberfläche auftretenden Veränderungen zu bekommen. Von den Untersuchungen wurde erwartet, daß sie offene Probleme über die spezifischen Reaktionen NDV-behandelter Erythrozyten zu klären helfen und weitere Hinweise über die Wirkung der Virus-Neuraminidase an Zell-Oberflächen liefern.

II. Das Newcastle disease Virus

Das NDV, dessen Struktur in den letzten Jahren weitgehend aufgeklärt werden konnte, gehört wie alle Myxoviren zu den komplex aufgebauten animalen Viren (Rott, 1964, 1965). Es enthält in seinem Innern eine fadenförmige Komponente, die einen Durchmesser von etwa 170 Å und eine errechnete Länge von etwa 30 000 Å besitzt. Sie besteht chemisch aus Protein und Ribonukleinsäure (etwa 10 %) und wird entspre-

chend als Ribonucleoproteid (RNP)-Antigen bezeichnet. In seiner Feinstruktur erinnert das RNP-Antigen an die des Tabakmosaikvirus, d.h. die Protein-Untereinheiten sind schraubenförmig um einen zentralen Hohlkanal von 50 Å Durchmesser angeordnet. Die Ganghöhe der Helix wird mit 60 Å angegeben. Das RNP-Antigen ist der eigentliche Träger des genetischen Materials des Viruspartikels. Es ist im isolierten Zustand nicht infektiös und läßt sich nur mit Hilfe serologischer Methoden als virusspezifische Einheit erfassen.

Umgeben ist das RNP-Antigen von einer Außenhülle, die chemisch aus Protein, Lipid und Kohlenhydrat besteht. Auf ihr sind die hämagglutinierende, immunogene, toxische und Neuraminidase-Aktivität des Viruspartikels lokalisiert. Aufschlüsse über ihre Struktur wurden erhalten, als es gelang, einige biologisch aktive Untereinheiten zu isolieren (Rott, 1964, 1965). Durch Behandeln der intakten Viruspartikel mit Äther bzw. Äther-Tween gelang es aus der Außenhülle eine Komponente zu extrahieren, die auf Grund ihrer biologischen Eigenschaften als Hämagglutinin bezeichnet wurde. Es repräsentiert sich im elektronenmikroskopischen Bild als ein rosettenartiges Gebilde mit einem Durchmesser von 350 - 650 Å. Chemische Untersuchungen lassen den Schluß zu, daß es aus Proteinen und Kohlenhydraten besteht. Das Hämagglutinin ist Träger der hämagglutinierenden, immunogenen und Neuraminidase-Aktivität des Virus.

Eine nicht-hämagglutinierende, Neuraminidase-haltige Komponente läßt sich durch Behandeln des NDV mit n-Butanol und Trypsin (Drzeniek und Rott, 1963) extrahieren. Ihr Molekulargewicht scheint zwischen $1 - 2 \cdot 10^5$ zu liegen. Eingehendere Befunde über ihre physiko-chemischen und biologischen Eigenschaften liegen bisher noch nicht vor.

Es spricht einiges dafür, daß die für die toxische Wirkung des NDV verantwortliche Komponente ein Glycolipoid ist (vergl. Rott und Müller, 1965).

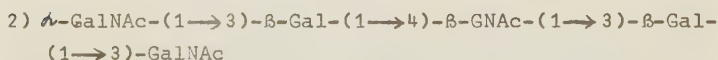
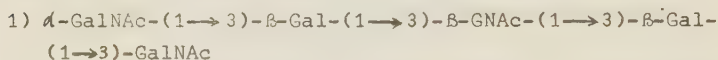
Neben den virusspezifischen Komponenten wird beim Zusammenbau des NDV noch wirtsspezifisches Material in die Virusoberfläche eingebaut, das Lipoid-Charakter besitzt und offensichtlich zum Zusammenhalt des Viruspartikels dient. Es läßt sich durch physiko-chemische Verfahren, die die Integrität des NDV nicht verletzen, nicht vom Viruspartikel abtrennen. Dieses als "Normale Komponente" bezeichnete Material macht nach Munk und Schäfer (1951) etwa 40 % der Virusmasse aus.

III. Blutgruppenspezifische Eigenschaften der Erythrozyten-Oberfläche

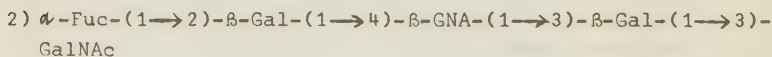
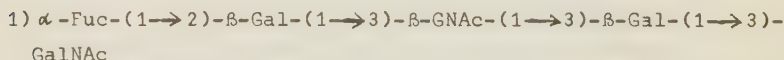
Im Zusammenhang mit der erwähnten Agglutinationsreaktion zwischen Viren und roten Blutkörperchen interessiert an den Erythrozyten vor allem ihre Oberfläche (vergl. Prokop und Uhlenbruck, 1963). Diese wird durch eine Membran gebildet, die vorwiegend aus Proteinen, Kohlenhydraten und Lipoiden aufgebaut ist. Die strukturierte Anordnung dieser Bausteine bewirkt die Unterschiede in den serologischen Reaktionen der Erythrozyten.

Bekanntlich unterscheidet man beim Menschen Erythrozyten der Blutgruppen A, AB, B und O. Außerdem sind viele andere Merkmale bekannt, deren wichtigste die M- und N-Eigenschaften und der Rhesusfaktor D (Rh_0) sein dürften. Alle Erythrozyten des Menschen werden durch Myxoviren agglutiniert. Die dafür verantwortlichen Rezeptoren, Myxovirus-Rezeptoren genannt, stellen - wie bereits erwähnt - nach den jetzigen Kenntnissen die N-Acylneuraminsäuren (Sialinsäuren) dar. Auch für die M- und N-Blutgruppen-Eigenschaften ist die Anwesenheit von Sialinsäure

notwendig, reagieren doch mit Neuraminidase-behandelte Erythrozyten nicht mehr mit einem homologen Anti-M-Serum. Obwohl erst einige Arbeiten über die Struktur der erythrozytären A, B, O-Substanzen vorliegen, kann man doch auf Grund von Hemmversuchen zwischen Erythrozyten und entsprechend isolierten, löslichen Blutgruppen-Substanzen (vorwiegend aus Ovarialcysten gewonnen) auf die Struktur der für die serologischen Eigenschaften verantwortlichen Substanzen schließen. Von Morgan (1964) wurde gezeigt, daß für die Blutgruppen-A-Spezifität ein Kohlenhydrat, und zwar ein Pentasaccharid folgender Struktur verantwortlich ist (beide Arten 1) und 2) kommen vor):



Das Blutgruppen-B-Antigen unterscheidet sich nur im endständigen Monosaccharid vom A-Antigen; es enthält anstelle von N-Acetylgalaktosamin, Galaktose; H-Substanz enthält dagegen folgendes Pentasaccharid (Rege et al., 1964):



Gewisse Schwierigkeiten bei der Strukturaufklärung der Blutgruppen-Substanzen bestehen in der Zuordnung von L-Fucose und Sialinsäure in den analysierten Substanzen, wegen der leichten Hydrolysierbarkeit von Fucose und Sialinsäureresten. Die Strukturen von M-, N- und D(Rh₀)-Substanz sind weitgehend unbekannt. Wie später gezeigt wird, gelang es durch Neuraminidase-Einwirkung endständige Sialinsäuren abzuspalten und die darunter liegenden, kohlenhydrathaltigen Rezeptoren zu analysieren.

* Abkürzungen:

Gal = D-Galaktose

Nac = N-Acetyl

GN = D-Glukosamin

Fuc = L-Fucose

IV. Material und Methoden

1. Virus

Für unsere Untersuchungen benutzten wir ein durch fraktioniertes Zentrifugieren gewonnenes Konzentrat des NDV-Stammes "Italien". Das Konzentrat wurde auf 128 hämagglutinierende Einheiten eingestellt.

2. Neuraminidase von Vibrio cholerae (RDE)

Es wurde das gereinigte Präparat der Neuraminidase aus Vibrio cholerae (RDE) der Behringwerke AG Marburg verwendet, das frei von Fermenten mit proteolytischer und Aldolase-Wirkung ist.

3. Erythrozyten

Benutzt wurden Erythrozyten vom Menschen der Blutgruppen A,B und O, die uns freundlicherweise von der Blutbank der Chirurgischen Universitätsklinik in Gießen zur Verfügung gestellt wurden sowie Erythrozyten vom Hund, Rind, Schaf, Pferd und Huhn. Das entsprechende Blut wurde jeweils in Citrat-Lösung aufgefangen, zentrifugiert und anschließend 3-mal mit isotonischer NaCl-Lösung oder mit isotonischer Phosphatpuffer-Lösung (pH = 7,2) gewaschen.

4. Seren

Die nach der Zentrifugation der Erythrozyten erhaltenen Seren wurden als Normal-Isoseren gegen Erythrozyten der

gleichen Spezies eingesetzt. Als spezifische Immunseren benutzten wir Anti-A- und Anti-B-Seren der Firma Biotest, Frankfurt/M.

Das Forssman-Antigen-Antiserum (F-Antiserum) wurde uns freundlicherweise von Herrn Priv. Doz. Dr. Löffler, Basel, überlassen. Es handelt sich um Seren von Kaninchen, die mit alkoholischem Meerschweinchen-Nierenextrakt hyperimmunisiert worden waren.

Serum von Patienten, die an infektiöser Mononukleose erkrankt waren (Mononukleose-Serum), erhielten wir von den Hygiene-Instituten der Universitäten Basel, Freiburg, Gießen und Tübingen.

Als Anti-Hammelerythrozyten-Serum wurde der "Hämolytische Ambozeptor" der Behringwerke AG, Marburg, verwendet.

Das NDV-Antiserum wurde von Hühnern gewonnen, die mit dem apathogenen NDV-Stamm "Beaudette" geimpft waren, 14 Tage später mit etwa 10^6 plaquebildenden Einheiten des NDV-Stammes "Italien" infiziert und nach weiteren 12 Tagen durch Herzpunktion entblutet wurden.

5. Phyttagglutinine

Die Phyttagglutinine stammte zum größten Teil aus dem Medizinal-Untersuchungsamt Fulda (Krüpe, 1956; Krüpe und Ensgraber, 1962).

Anti-H-Phyttagglutinine

aus Laburnum alpinum (käuferliches Reagens in flüssiger Form der Firma Asid, München). Agglutinationstiter mit O-Erythrozyten vom Mensch im NaCl-Milieu = 1 : 8, mit A_1 = negativ; mit A_2 = 1 : 16.

aus Ulex europaeus (Extraktion aus gemahlenem Samen in üblicher Weise). Agglutinationstiter mit O-Erythrozyten im NaCl-Milieu = 1 : 8, mit A₁ = negativ;

aus Lotus tetragonolobus (säulenchromatographisch angereichertes, lyophil getrocknetes Präparat 1 %ig in gepufferter NaCl-Lösung pH = 7,2 gelöst). Agglutinationstiter mit O-Erythrozyten im NaCl-Milieu = 1 : 8, mit A₁ = negativ;

Anti-A-Phytagglutinine

Angereichertes und lyophil getrocknetes Präparat aus Samen von Dolichos biflorus 1 %ig in gepufferter NaCl gelöst. Agglutinationstiter mit A₁-Erythrozyten im NaCl-Milieu = 1 : 16, mit A₂ = negativ;

Vicia cracca (lyophil getrocknetes, angereichertes Präparat aus Samen). Agglutinationstiter mit A₁-Erythrozyten im NaCl-Milieu = 1 : 4096, mit A₂-Erythrozyten = 1 : 1024, mit B-Erythrozyten = 1 : 16, mit O-Erythrozyten = 1 : 16;

Phaseolus limensis (Rohextrakt aus Samen). Agglutinationstiter mit A₁-Erythrozyten = 1 : 128, mit A₂-Erythrozyten = 1 : 32, mit B- und O-Erythrozyten = negativ.

Anti-B-Phytagglutinine

aus Sophora japonica (angereichertes, lyophil getrocknetes Präparat aus Samen, 1 %ig in gepufferter NaCl gelöst). Agglutinationstiter mit B-Erythrozyten = 1 : 256, mit A₁ = 32, mit O = negativ;

aus Marasmius oreades (getrocknete 6 Jahre alte Pilze, zerkleinert, im Mörser zerrieben und mit gepuffelter NaCl-Lösung in üblicher Weise extrahiert und zentrifugiert). Überstand als Reagens. Agglutinationstiter mit B-Erythrozyten im NaCl-Milieu = 1 : 6, mit O = 1 : 6, mit A₁ = negativ;

aus Polyporus fomentarius (Preßsaft eines im Oktober 1964 von einer absterbenden Buche entnommenen Pilzes, in der Tiefkühltruhe bei -20° aufbewahrt). Agglutinationstiter mit B-Blutzellen im NaCl-Milieu = 1 : 32, mit A und O = negativ. Ein anderes Präparat hatte einen Titer mit B-Blutzellen = 1 : 8, mit A und O = negativ.

6. Forssman-Antigen (F.Ag.)

Als Forssman-Antigen-haltiges Substrat wurde getrocknetes Meerschweinchen-Nierengewebe verwendet (Tomcsik, 1961).

7. Trypsinierte Rinder-Erythrozyten

Gewaschene Rinder-Erythrozyten wurden mit 200 µg/ml Trypsin (Nutritional Biochemicals Corporation, Cleveland, Ohio) 30 Min. lang bei pH 8 (37° C) behandelt (Tomcsik, 1961).

8. Behandlung der Erythrozyten mit NDV

Gewaschene und gepackte Erythrozyten wurden im Verhältnis 1 : 2 mit einer Viruslösung (pH = 7,2), die 128 HA-Einheiten und 30 Enzym-Einheiten/ml enthielt, 2 Std. bei 37° C gehalten. Anschließend wurden die Erythrozyten

durch mehrmaliges Zentrifugieren und Resuspendieren in frisch zugefügter NaCl-Lösung gewaschen und danach als 1 %ige Suspension in isotonischer NaCl-Lösung oder in isotonischer Phosphatpuffer-Lösung pH = 7,2 für die Tests verwendet.

9. Behandlung der Erythrozyten mit RDE

Die gepackten Erythrozyten wurden zunächst mit 0,1 M Acetatpuffer (pH = 5,5; 0,1 % an $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ und 0,9 % an NaCl) 3-mal gewaschen und danach mit dem gleichen Volumen an RDE, welches im gleichen Acetatpuffer gelöst war, versetzt und 2 Std. bei 37° C gehalten. Für die Behandlung der Erythrozyten vom Menschen wurde eine RDE-Konzentration benutzt, die 1 Neuraminidase-Einheit/ml enthielt und die gleiche Menge an Sialinsäure wie die NDV-Neuraminidase nach 2-stündiger Inkubation aus den Erythrozyten abspaltet. Die Hühner-Erythrozyten wurden mit 4 Neuraminidase-Einheiten/ml inkubiert. Die RDE-behandelten Erythrozyten wurden anschließend wie die NDV-behandelten gewaschen und suspendiert.

10. Bestimmung der Neuraminidase-Aktivität

Als Substrat wurde N-Acetylneuraminsäure-Lactose (General Biochemicals, Chagrin Falls, Ohio) benutzt. Die in Freiheit gesetzte NANS wurde mit der Thiobarbitursäure-Methode nach Aminoff (1961) bestimmt, die Extinktion jedoch bei 552 m μ gemessen. Eine Enzym-Einheit entspricht der Freisetzung von 1 nMol NANS in 1 Minute unter den angegebenen Bedingungen. Bei der NDV-Neuraminidase wurde die NANS-Menge, welche in 15 Min. aus 100 γ N-Acetylneuraminsäure-Lactose in einem 0,5 ml Ansatz abgespalten wurde, in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,0; 37° C) bestimmt.

Beim RDE wurde die Enzym-Aktivität dagegen in 0,1 m Acetatpuffer, der 0,1 % $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ und 0,9 % NaCl enthielt, bei pH 5,5 unter den bereits oben beschriebenen Bedingungen bestimmt.

11. Bestimmung der aus Erythrozyten freigesetzten Sialinsäure

0,5 ml NDV (64 - 128 HA-Einheiten) entsprechend 15 - 30 Enzym-Einheiten/ml wurden mit 0,5 ml gepackten Erythrozyten bei 37° C abgekühlt und nach Zugabe von 2 ml isotonischem Phosphatpuffer (pH 7,2) zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der im Überstand enthaltenen Sialinsäure mit dem Thiobarbitursäure-Test.

Die Abspaltung von Sialinsäure mit RDE erfolgte auch hier bei pH 5,5; die Verdünnung wurde mit Acetatpuffer vorgenommen. Die zur Verfügung stehende V. cholerae-Neuraminidase wurde bei der Behandlung der Menschen-Erythrozyten auf 1 Enzym-Einheit/ml und bei den Hühner-Erythrozyten auf 4 Enzym-Einheiten/ml verdünnt.

12. Agglutinationsreaktion

Die Bestimmung des Hämagglutinations(HA-)-Titers erfolgte durch Verdünnung von 0,4 ml Test-Serum bzw. Phyttagglutinin in 2er-Potenzen und Zugabe von 0,4 ml Erythrozyten-Suspension (1 %). Die Reaktion wurde nach 45 Min. bei Raumtemperatur abgelesen. Bei den Hemmversuchen wurde 0,2 ml Test-Serum bzw. Phyttagglutinin-Verdünnung mit 0,2 ml der entsprechenden Inhibitorlösung, 30 Min. bei Raumtemperatur vorinkubiert. Danach erfolgte die Zugabe der Erythrozyten.

13. Hämolyse-Reaktion

Zu 0,2 ml einer Verdünnungsreihe von F-Antiserum bzw. Hämolytischem Ambozeptor wurden jeweils 0,2 ml 1 : 15 verdünntes Komplement (Behringwerke AG) und 0,4 ml einer 1 %igen Hammelerythrozyten-Suspension gegeben, die Mischung 45 Min. lang bei 37° C inkubiert und danach die Reaktion abgelesen.

14. Coombs-Test

Zu einer Verdünnungsreihe von 0,2 ml blutgruppenspezifischem Iso serum wurden 0,4 ml einer 1 %igen Suspension von NDV-behandelten Menschen-Erythrozyten gegeben und gut durchgemischt. Nach 60 Min. langer Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Erythrozyten aus jedem Ansatz abzentrifugiert und 4-mal mit phosphatgepufferter NaCl-Lösung (pH 7,2) gewaschen. Das so erhaltene Erythrozyten-Sediment wurde in 0,5 ml einer 10 %igen Antihuman- γ -Globulin-Suspension von Kaninchen (Behringwerke AG) aufgenommen und die Agglutination 60 Min. später abgelesen. Als Kontrolle diente ein entsprechender Ansatz, bei dem anstelle von NDV-behandelten, normale Menschen-Erythrozyten verwendet wurden.

15. Inhibitoren

Die ABH-Substanz bezogen wir von Merck, Sharp & Dohme, (Rahway, New Jersey).

Die Mono- und Di-Saccharide wurden in 0,5 %iger bzw. 1 %iger Lösung in isotonischem Phosphatpuffer benutzt. L-Fucose, 0,5 %ig (Sigma, St. Louis), N-Acetyl-D-Galaktosamin, 0,5 %ig (Sigma), D-Galaktose, 1 %ig (Schuchardt,

München), D-Glucose-Monohydrat, 1 %ig (Fluka, Buchs S.G., Schweiz), D-Salicin, 1 %ig (Fluka), N-Acetyl-D-Glucosamin, 1 %ig (Sigma).

V. Untersuchungsergebnisse

A. Neuraminidase-bedingte Veränderungen an der Erythrozyten-Oberfläche

1. Freilegung von ABH-Blutgruppen determinierenden Kohlenhydraten an Erythrozyten-Oberflächen.

Es ist bekannt, daß ABH-spezifische kohlenhydrathaltige Rezeptoren bei Mensch, Tier, Pflanzen und bei Bakterien häufig vorkommen. Ihre Spezifität wird - wie einleitend bereits erwähnt - durch mindestens 3 Monosaccharide bestimmt. In etwas vereinfachter Form kann gesagt werden, daß endständiges N-Acetyl-D-Galaktosamin determinierend für Blutgruppe A ist, D-Galaktose für B und L-Fucose sowie möglicherweise N-Acetyl-D-Glucosamin für H. Da die Erythrozyten-Oberfläche reich an Sialinsäure ist, die an Kohlenhydrate der Mucoide oder Glycolipoide endständig gebunden ist, wurde zunächst geprüft, ob nach Behandlung der Erythrozyten mit NDV bzw. RDE ABH-determinierende Kohlenhydrate vermehrt oder sogar neu auftreten.

a) Abspaltung von Sialinsäure aus Erythrozyten des Menschen und des Huhnes.

Zur Festlegung der Versuchsbedingungen wurde die Abspaltung von Sialinsäure aus Erythrozyten des Menschen und des Huhnes in Abhängigkeit von der Zeit - wie oben beschrieben - untersucht.

Abb. 1

Abspaltung von Sialinsäure von Menschen-Erythrozyten durch
RDE (●—●). bzw. NDV (▲—▲).

NANS = N-Acetyl-Neuraminsäure

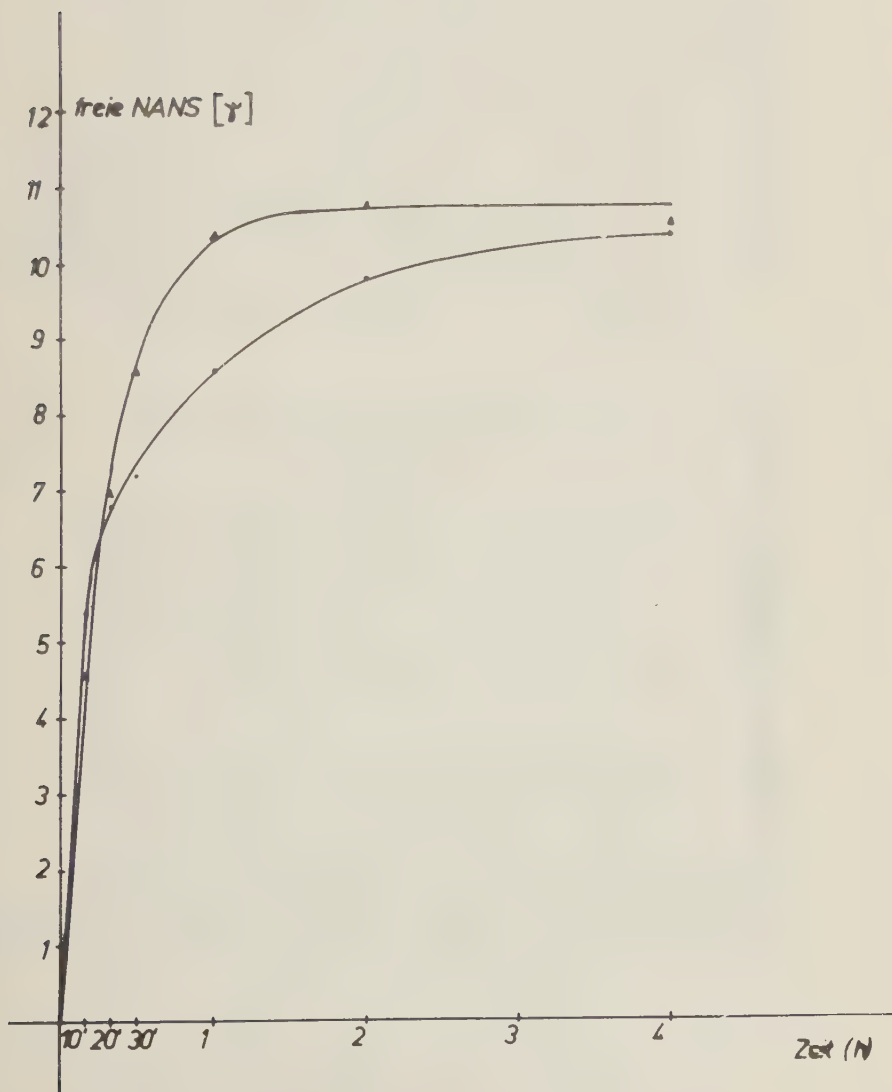
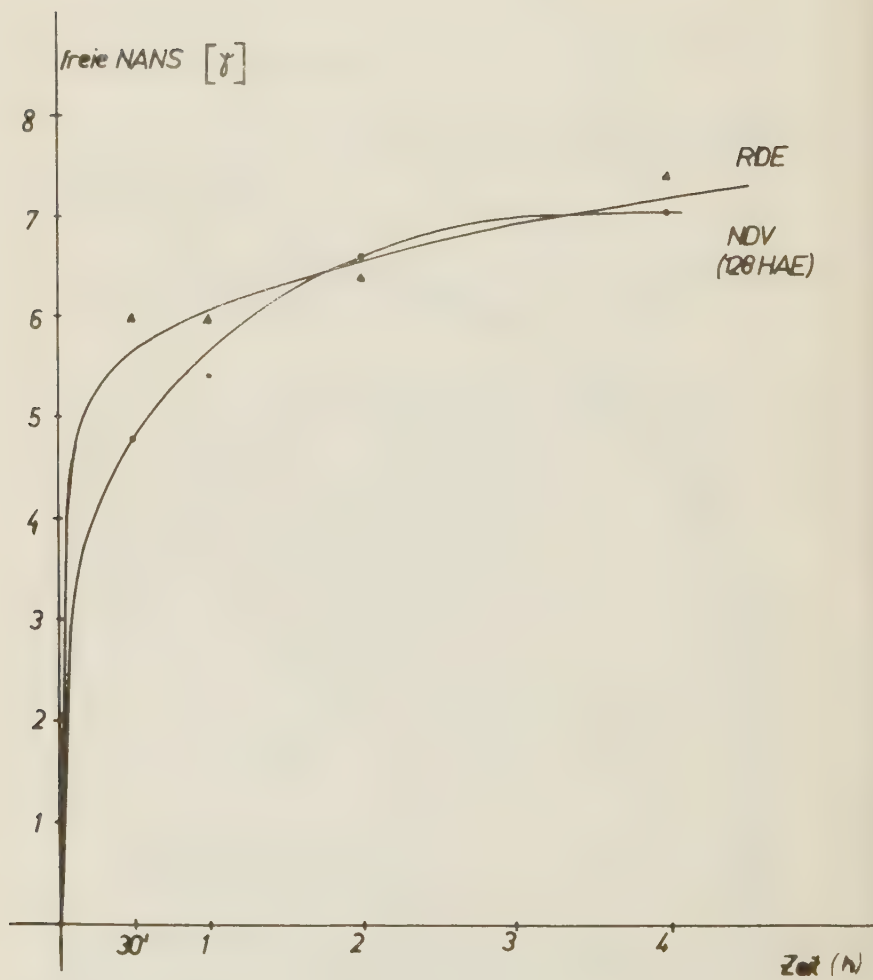


Abb. 2

Abspaltung von Sialinsäure von Hühner-Erythrozyten durch
RDE (●—●) bzw. NDV (▲—▲).

NANS = N-Acetyl-Neuraminsäure



Wie aus den in den Abbildungen 1 und 2 dargestellten Ergebnissen hervorgeht, zeigen beide Enzyme bei entsprechenden Konzentrationen eine ähnliche Kinetik der Sialinsäure-Abspaltung. Auffallend dabei war, daß für die Abspaltung einer gleichen Sialinsäure-Menge bei Menschen-Erythrozyten eine höhere Aktivität an Virus-Neuraminidase notwendig war als an RDE, wobei die Neuraminidase-Aktivität unter Benutzung von Sialolactose als Substrat bestimmt wurde. Mit beiden Enzymen ist nach 30 Min. die Hauptmenge der Sialinsäure freigesetzt. Das Plateau wird nach 1 - 2 Stunden erreicht. Danach werden keine größeren Sialinsäure-Mengen mehr abgespalten. In den folgenden Versuchen wurden daher die NDV- bzw. RDE-Lösungen auf die verwendete Neuraminidase-Konzentration eingestellt und damit die entsprechenden Erythrozyten 2 Stdn. bei 37° C bebrütet.

b) Freisetzung von blutgruppenspezifischen Kohlenhydraten von Erythrozyten des Menschen.

Die ABH-determinierenden Kohlenhydrate wurden mit Hilfe der in Abschnitt "Material und Methodik" vorgestellten Phyttagglutinine zu erfassen versucht. Sie eignen sich besonders für derartige Untersuchungen, da sie streng spezifisch gegen die entsprechenden Monosaccharide gerichtet sind und keine unübersichtlichen Nebenreaktionen erwarten lassen.

Zum Nachweis der Blutgruppen-A-Spezifität wurden die Phyttagglutinine aus *Dolichos biflorus*, *Phaseolus limensis* und *Vicia cracca* verwendet. Aus Tabelle 1 ist zu entnehmen, daß Neuraminidase-behandelte Erythrozyten des Menschen der Blutgruppen B und O mit *Dolichos biflorus* und *Phaseolus limensis* keine Agglutinationsreaktion geben. Grundsätzlich reagierten die behandelten Erythrozy-

Tabelle 1

Nachweis der Blutgruppen-A-Spezifität mit *Dolichos biflorus*, *Phaseolus limensis* und *Vicia cracca*.

Phytagglutinine	Blutgruppen- spezifität	Inhibitor	Unter- suchte Blut- gruppe	Normal-Erythrozyten			NDV-Erythrozyten		
				HA-Titer ohne Inhibitor	HA-Titer mit Inhibitor	Hemm- faktor	HA-Titer ohne Inhibitor	HA-Titer mit Inhibitor	Hemm- faktor
<i>Dolichos biflorus</i>	Anti-A	N-Acetyl- D-Galak- tosamin	A	16	< 2	> 8	128	< 2	> 64
			B	< 2	-	-	< 2	-	-
			O	< 2	-	-	< 2	-	-
<i>Phaseolus limensis</i>	Anti-A	N-Acetyl- D-Galak- tosamin	A	28	-	-	1024	-	-
			A	< 2	-	-	128	-	-
			A	< 2	-	-	8	-	-
<i>Vicia cracca</i>	Anti-A	N-Acetyl- D-Galak- tosamin	A	3	< 2	> 1,5	64	< 2	> 32
			B	< 2	-	-	< 2	-	-
			O	< 2	-	-	< 2	-	-
<i>Vicia cracca</i>	Anti-A	N-Acetyl- D-Galak- tosamin	A	2048	16	128	8192	64	128
			B	32	16	2	256	128	2
			O	32	16	2	256	128	2
<i>Vicia cracca</i>	Anti-A	D-Glucose	A	2048	1024	2	8192	8192	1
			B	32	2	16	256	16	16
			O	32	2	16	256	16	16

ten der Blutgruppe A mit den beiden Phyttagglutininen, wobei der Titeranstieg gegen *Dolichos biflorus* unterschiedlich stark ausgeprägt war. Im Verlauf der Untersuchungen ergab sich, daß Erythrozyten der Gruppe A₁ mit *Dolichos* nach der Enzym-Behandlung einen sehr hohen Titeranstieg gaben. Erythrozyten der Blutgruppe A₂, die normalerweise nicht mit *Dolichos* reagieren, zeigten manchmal einen ähnlich starken Titeranstieg wie solche der Gruppe A₁, manchmal aber auch nur eine relativ geringe Verstärkung der Reaktion. Die Agglutination der benutzten Anti-A-Phyttagglutinine ließ sich immer mit N-Acetyl-D-Galaktosamin vollständig hemmen, nicht dagegen mit D-Galaktose. Mit *Vicia cracca* reagierten neben den A-Erythrozyten auch die Enzym-behandelten Erythrozyten der Blutgruppen B und O. Dieses Phyttagglutinin ließ sich außer durch N-Acetyl-D-Galaktosamin auch durch D-Glucose hemmen, was ein Hinweis dafür ist, daß im *Vicia cracca*-Extrakt mehr als ein Phyttagglutinin vorhanden ist. Berücksichtigt man einmal, daß nur die Neuraminidase-behandelten Erythrozyten der Gruppe A durch N-Acetyl-D-Galaktosamin gehemmt werden können und zum anderen, daß *Dolichos* und *Phaseolus* streng Anti-A-spezifisch sind, so sagen die Befunde, daß durch NDV oder RDE nur an den A-Erythrozyten das blutgruppen-spezifische Kohlenhydrat N-Acetyl-D-Galaktosamin freigesetzt wird.

Die Blutgruppe B wurde mit Hilfe der Phyttagglutinine aus *Polyporus fomentarius*, *Sophora japonica* und *Marasmius oreades* nachgewiesen. Wie Tabelle 2 zeigt, wird nach Neuraminidase-Behandlung bei Erythrozyten der Blutgruppen A, B und O ein deutlicher Titeranstieg mit *Polyporus fomentarius* beobachtet, der sich durch D-Galaktose, nicht dagegen durch L-Fucose und N-Acetyl-D-Glucosamin hemmen ließ.

Tabelle 2

Nachweis der Blutgruppen-B-Spezifität mit Polyporus fomentarius, Sophora japonica u. Marasmius oreades.

Phytagglutinine	Blutgruppenspezifität	Inhibitor	Untersuchte Blutgruppe	Normal-Erythrozyten				NDV-Erythrozyten			
				HA-Titer ohne Inhibitor	HA-Titer mit Inhibitor	Hemm-faktor	HA-Titer ohne Inhibitor	HA-Titer mit Inhibitor	Hemm-faktor		
Polyporus fomentarius	Anti-B	D-Galaktose 1 %	A B O	< 2 32 < 2	- < 2 -	- > 16 -	14 512 16	< 2 < 2 < 2	> 7 > 256 > 8		
Sophora japonica	Anti-B Anti-A	D-Galaktose 1 %	A B O	32 256 < 2	< 2 7 -	> 16 36 -	4096 28700 450	32 450 3	128 64 150		
Marasmius oreades	Anti-B Anti-H	N-Acetyl-D-Galaktosamin 0,5 %	A B O	56 512 < 2	< 2 2 -	> 28 256 -	4096 28700 450	< 2 16 < 2	> 2048 1800 > 225		
Marasmius oreades	Laktose 1 %	Laktose 1 %	A B O	< 2 6 6	- - -	- - -	24 32 32	4 4 4	6 8 8		
Marasmius oreades	ABH-Substanz	ABH-Substanz	A B O	2 6 7	- < 2 2	- > 3 3,5	128 64 64	3 4 4	43 16 16		

Nicht so eindeutig sind die Versuchsergebnisse bei denen die Freisetzung von B-Rezeptoren durch *Sophora japonica* bzw. *Marasmius oreades* nachgewiesen werden sollte. Die verwendeten Phyttagglutinine besitzen außer der B-Blutgruppenspezifität noch A- bzw. H-Spezifität. Auch mit Hilfe dieser Phyttagglutinine konnte nach Neuraminidase-Einwirkung bei allen getesteten Blutgruppen ein deutlicher Titeranstieg festgestellt werden. Die Versuche geben einen Hinweis darauf, daß auf der Oberfläche aller getesteten Menschen-Erythrozyten durch Neuraminidase-Behandlung D-Galaktose freigelegt wird.

Ob eine Freisetzung von Blutgruppen-H-determinierenden Kohlenhydraten stattfindet, wurde mit Hilfe von Phyttagglutininen aus *Lotus tetragonolobus* und *Ulex europaeus*, die beide durch L-Fucose hemmbar sind, nachzuweisen versucht. Die entsprechenden Ergebnisse (vergl. Tab. 3) sind insofern interessant, als beide Testreagentien sämtliche verwendeten Erythrozyten, gleich welcher Blutgruppenzugehörigkeit, nach Behandlung mit Neuraminidase deutlich agglutinierten. Individuelle Unterschiede sind aus Tabelle 3 zu entnehmen. In allen Fällen konnte die Agglutinationsreaktion durch L-Fucose vollständig gehemmt werden. Bei *Ulex europaeus* war darüber hinaus eine schwache Hemmung mit D-Salicin zu beobachten. Nicht durch L-Fucose, jedoch eindeutig durch D-Salicin hemmbar, war die Reaktion der behandelten Erythrozyten mit *Laburnum alpinum*, welches ebenfalls ein Anti-H-Reagens ist; jedoch wird von ihm das N-Acetyl-D-Glucosamin-Molekül als H-determinierend erfaßt, nicht die L-Fucose. Auch mit diesem Extrakt war bei allen Blutproben ein signifikanter Titeranstieg, verglichen mit nichtbehandelten Kontrollen, festzustellen. Bemerkenswert ist, daß der Titeranstieg mit *Laburnum alpinum* und *Lotus tetragonolobus* bei den einzelnen Blutgruppen nicht parallel verlief. So reagierten behandelte O-Erythrozyten,

Tabelle 3

Nachweis der Blutgruppen-H-Spezifität mit *Lotus tetragonolobus*, *Ulex europaeus* u. *Laburnum alpinum*.

Phytagglutinine	Blutgruppenspezifität	Inhibitor	Untersuchte Blutgruppe	Normal-Erythrozyten				NDV-Erythrozyten			
				HA-Titer ohne Inhibitor	HA-Titer mit Inhibitor	Hemmfaktor	HA-Titer ohne Inhibitor	HA-Titer mit Inhibitor	Hemmfaktor		
Lotus tetragonolobus	Anti-O (H)	L-Fucose 0,5 %	A B O	< 2	-	-	32	< 2		> 16	
				< 2 4	- < 2	- > 2	256 > 1000	< 2 < 2	> 128 > 500		
Ulex europaeus	Anti-O (H)	L-Fucose 0,5 %	A B O	< 2	-	-	12	< 2		> 6	
				< 2 8	- < 2	- > 4	32 112	< 2 < 2	> 16 > 56		
		D-Salicin 1 %	A B O	< 2	-	-	12	6		2	
				< 2 4	- < 2	- > 2	32 4	- 4	- 0		
Laburnum alpinum	Anti-O (H) Anti-A ₂	D-Salicin 1 %	A ₁ A ₂ B O	2	-	-	128	8		16	
				< 16	< 2	> 8	256	16	16		
				< 2 8	- < 2	- > 4	512 128	16 16		32 8	

wenn sie mit Lotus getestet wurden, viel stärker als behandelte B- oder A-Erythrozyten. Mit Laburnum getestete Erythrozyten zeigten dagegen die stärksten Titeranstiege mit den uns zur Verfügung gestellten Erythrozyten der Blutgruppe B (s. Tab. 3).

Der beschriebene Titeranstieg bei den Agglutinations-Versuchen mit Phyttagglutininen kann nicht auf Wirksamwerden der sogenannten "inkompletten" Phyttagglutinine infolge der Neuraminidase-Behandlung beruhen. Das geht aus folgendem Versuch hervor: Erythrozyten der Blutgruppen A und B wurden mit den Phyttagglutininen aus Lotus bzw. Laburnum, Erythrozyten der Blutgruppe O mit solchen aus Sophora, 30 Min. bei Raumtemperatur gehalten und anschließend dreimal mit physiologischer NaCl-Lösung gewaschen. Daraufhin wurden sie in üblicher Weise mit Neuraminidase inkubiert. Dieser Versuch sollte klären, ob möglicherweise gebundene "inkomplette" Phyttagglutinin-Moleküle durch Neuraminidase-Behandlung zur sichtbaren Agglutination der Erythrozyten führen. Wie Tabelle 4 ausweist, wurde dieser Effekt nicht beobachtet. Nach erneuter Zugabe desselben Phyttagglutinins verhielten sich diese Erythrozyten ebenso wie die nicht mit Phyttagglutinin vorbehandelten Kontrollen.

c) Veränderung der blutgruppenspezifischen Eigenschaften von Tier-Erythrozyten.

Interessiert haben bei den Untersuchungen mit Erythrozyten vom Huhn, Rind, Pferd, Schaf und Hund ebenfalls die durch die Neuraminidase-Einwirkung auf der Zelloberfläche freigesetzten kohlenhydrathaltigen Rezeptoren, die wir wiederum mit Hilfe der blutgruppenspezifischen Phyttagglutinine zu erfassen suchten. Wie Tabelle 5 zeigt, reagieren Neuraminidase-behandelte Rinder-Erythrozyten mit den Anti-B-Phyttagglutininen aus Polyporus fomenta-

Tabelle 4

Versuch zum Nachweis inkompletter Phyttagglutinine mit NDV-behandelten Erythrozyten.

Phyttagglutinine	Normale Erythrozyten gegen entsprechend verdünntes Phyttagglu- tinin getestet: HA-Titer	HA-Titer nach Inku- bation der Erythro- zyten u. NDV-Behand- lung.	HA-Titer der mit Phyttag- glutinin u. anschließend NDV-behandelten Erythro- zyten nach erneuter Phyttagglutininzugabe.	HA-Titer der nicht mit Phyttagglutinin vorinku- bierten, NDV-behandel- ten Erythrozyten
Sophora japonica	< 2	< 2	256	128
Lotus tetragonolobus	< 2	< 2	14	8
Laburnum alpinum	< 2	< 2	-	-

Tabelle 5

Agglutinationsreaktion der NDV-behandelten und nicht behandelten Tier-Erythrozyten mit Phytagglutininen.
 0 = HA-Titer > 2

Erythrozyten des Tieres	Lotus tetragonolobus		Ulex europaeus		Laburnum alpinum		Sophora japonica		Marasmius oreades		Polyporus fomentarius		Dolichos biflorus
	nicht behandelt	NDV- behandelt	nicht- behandelt	NDV- behandelt	nicht- behandelt	NDV- behandelt	nicht- behandelt	NDV- behandelt	nicht- behandelt	NDV- behandelt	nicht- behandelt	NDV- behandelt	
Huhn	0	0	0	0	0	128	0	32	0	8	0	8	0
Rind	0	0	0	0	0	0	0	32	0	7	0	4	0
Pferd	3	7	0	0	0	0	0	128	0	0	0	0	0
Schaf	0	3	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	0
Hund	-	3	-	-	-	32	-	8	0	64	32	448	0

Vergleich der Phytagglutinin-Reaktion mit Menschen-Erythrozyten

Blutgruppe	Lotus tetragonolobus		Ulex europaeus		Laburnum alpinum		Sophora japonica		Marasmius oreades		Polyporus fomentarius		Dolichos biflorus
	Normal	NDV	Normal	NDV	Normal	NDV	Normal	NDV	Normal	NDV	Normal	NDV	
A	0	128	0	7	0	32	16	1024	0	3	0	4	
B	0	448	0	32	2	64	512	1024	2	32	8	128	
O	8	1024	7	16	8	256	-	384	-	3	0	4	

rius, *Sophora japonica* und *Marasmius oreades*, nicht dagegen mit Anti-A- und Anti-H-Phytagglutininen. Die Reaktion mit *Polyporus*, *Sophora* und *Marasmius* beweist die Anwesenheit eines D-Galaktose-haltigen Rezeptors an den Rinder-Erythrozyten, worauf u.a. ihre Antigen-Gemeinschaft mit der menschlichen Blutgruppe B beruht. L-Fucose, N-Acetyl-D-Galaktosamin oder N-Acetyl-D-Glucosamin ist offensichtlich nicht freigelegt worden. Frei von L-Fucose-haltigen Rezeptoren sind auch Erythrozyten des Hühnes (negative Reaktion mit *Lotus tetragonolobus* und *Ulex europaeus*). Jedoch werden bei ihnen N-Acetyl-D-Glucosamin-haltige Rezeptoren freigelegt, wie aus der Reaktion mit *Laburnum* hervorgeht. Die Oberflächenstruktur der Hunde-Erythrozyten scheint ähnlich derjenigen von Menschenzellen zu sein. Bei ihnen wurden durch NDV-Einwirkung neben N-Acetyl-D-Glucosamin-haltigen und Galaktose- auch L-Fucose-haltige Rezeptoren erfaßt (Reaktion mit *Laburnum*, *Ulex*, *Lotus*, *Sophora*, *Marasmius*, *Polyporus*). Von allen untersuchten Tier-Erythrozyten reagierten nur die des Hundes mit den Blutgruppen-B-spezifischen Phytagglutininen aus *Polyporus fomentarius*, *Sophora japonica* und *Marasmius oreades*. Keine der getesteten Tier-Erythrozyten gaben jedoch mit *Dolichos biflorus* eine positive Agglutinationsreaktion, woraus zu schließen wäre, daß N-Acetyl-D-Galaktosamin hier nicht vorzukommen scheint.

d) Reaktion NDV-behandelter Erythrozyten mit blutgruppenspezifischen Antiseren.

Nachdem gezeigt wurde, daß durch Neuraminidase-Behandlung auf der Erythrozyten-Oberfläche neue blutgruppenspezifische Kohlenhydrate freigelegt werden, wurde geprüft, ob dadurch auch die blutgruppenspezifische Antigenstruktur verändert wird.

Zunächst prüften wir das Verhalten NDV-behandelter Erythrozyten der Blutgruppen A, B und O des Menschen gegenüber Isoseren. Als Kontrollen dienten nicht-behandelte Erythrozyten der entsprechenden Blutgruppen.

Dabei wurde beobachtet, daß der Agglutinationstiter bei allen NDV-behandelten Erythrozyten gegenüber den Kontrollen um das 4 - 8fache anstieg. Dasselbe Bild ergab sich nach der Behandlung der Erythrozyten mit RDE. Die Veränderungen dürften daher in beiden Fällen auf der enzymatischen Abspaltung von Sialinsäure von der Erythrozyten-Oberfläche beruhen. Daß es sich dabei nicht um eine Reaktion mit freigelegten blutgruppenspezifischen Rezeptoren handelt, geht aus Hemmversuchen hervor, bei denen auch durch relativ hohe Konzentrationen an ABH-Substanzen die Agglutination von NDV- bzw. RDE-behandelten Erythrozyten im Gegensatz zu den Kontrollen nicht vollständig inhibiert werden konnte. Der Titeranstieg ist auf die Reaktion der T-Agglutinine in den Isoseren mit den freigelegten T-Agglutinogenen zurückzuführen; nach Adsorption der Isoseren mit NDV-behandelten Erythrozyten der Blutgruppe O war kein Titeranstieg mehr festzustellen. Entsprechende Ergebnisse erhielten wir auch bei Verwendung von Hyperimmunseren. Die erzielten Befunde stehen in Übereinstimmung mit den Beobachtungen des Thomsen-Friedenreich'schen Phänomens ("Panagglutination") (Friedenreich, 1930; Uhlenbruck, 1961), wie es später ausführlicher behandelt wird.

Um zu entscheiden, ob die Diskrepanz zwischen dem Nachweis von blutgruppenspezifischen Kohlenhydraten mit Phyttagglutininen und dem Fehlen von entsprechendem Antigen auf der Erythrozyten-Oberfläche nach NDV-Behandlung durch sterische Hinderung der Antigen-Antikörper-Reaktion bedingt ist, wurden die Antigene im Coombs-Test nachzuweisen versucht.

Tabelle 6

Reaktion von NDV-behandelten Erythrozyten im Coombs-Test

Blutgruppen	Immunserum	Hämagglutination	Coombs-Test	Hemmung mit ABH-Substanz Hämagglutination	Coombs-Test
A	Anti-A	64	128	< 2	8
	Anti-B	< 2	32	< 2	32
B	Anti-A	< 2	16	< 2	16
	Anti-B	128	256	< 2	32
O	Anti-A	< 2	16	< 2	8
	Anti-B	< 2	32	< 2	16
A	Anti-B	< 2	< 2	-	-
B	Anti-A	< 2	< 2	-	-
O	Anti-A	< 2	< 2	-	-
	Anti-B	< 2	< 2	-	-

NDV-behandelt

nicht-behandelt

Wie aus Tabelle 6 hervorgeht, läßt sich zwar im Coombs-Test ein signifikanter Anstieg des Agglutinationstiters nach NDV-Behandlung feststellen, die Reaktion kann aber nicht durch ABH-Substanz gehemmt werden. Das bedeutet, daß der Titer-Anstieg ebenfalls auf die Anwesenheit von T-Agglutinogen zurückzuführen ist.

e) Freilegung von Blutgruppen-determinierenden Kohlenhydraten an Erythrozyten von Neugeborenen.

Bekanntlich lassen sich ~~An~~ Erythrozyten von Neugeborenen in einer Reihe von Fällen schlecht blutgruppenspezifische Antigene nachweisen. Es mag sein, daß diese in irgendeiner Form maskiert sind und erst in späteren Lebensstadien durch Erythrozyten ersetzt werden, die ausgeprägte serologische Eigenschaften besitzen. Nachdem wir zeigen konnten, daß durch Neuraminidase-Behandlung von Erythrozyten Erwachsener blutgruppenspezifische Kohlenhydrate freigelegt werden, war es naheliegend zu prüfen, ob durch diese Behandlung auch beim Nabelblut deutlich erkennbare Blutgruppen-Eigenschaften auftreten.

Das Nabelblut wurde uns in Form von Citratblut von der Frauenklinik der Justus Liebig-Universität Gießen, zur Verfügung gestellt. Das Blut wurde wie üblich aufgearbeitet und mit RDE bzw. NDV wie bereits beschrieben bei 37° C behandelt und mit Hyperimmunseren sowie mit Phytagglutininen getestet.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengestellt. Daraus geht hervor, daß nach Neuraminidase-Behandlung die Reaktion von Nabelblut-Erythrozyten mit homologen Hyperimmunseren im allgemeinen deutlicher wird. Das gilt im besonderem Maße für solche Erythrozyten, bei denen im nativen Zustand eine serologische Differenzierung nicht

möglich war. Die Befunde weisen sehr deutlich darauf hin, daß durch Neuraminidase-Behandlung an der Oberfläche von Nabelblut-Erythrozyten blutgruppenspezifische Antigene freigelegt werden können. Inwieweit die Methode generell zur Bestimmung der Blutgruppen-Spezifität bei Neugeborenen verwendet werden kann, müssen weitere Untersuchungen an einem größeren Untersuchungsmaterial ergeben.

Gegenüber Phyttagglutininen verhielten sich die Erythrozyten von Neugeborenen im allgemeinen ähnlich wie solche von erwachsenen Menschen. So war bei Neuraminidase-behandelten Nabelblut-Erythrozyten aller Blutgruppen mit *Ulex europaeus*, *Lotus tetragonolobus*, *Laburnum alpinum* und *Marasmius oreades* ein sehr deutlicher Titeranstieg gegenüber nichtbehandelten Erythrozyten festzustellen (Tab. 8). Die Reaktion von behandelten Erythrozyten aller Blutgruppen mit *Sophora japonica* und die der Blutgruppen A und B mit *Dolichos biflorus* war dagegen durchweg weniger stark ausgeprägt wie diejenige von behandelten Blutzellen Erwachsener.

Die Versuchsergebnisse weisen darauf hin, daß die serologisch erfaßbare Oberflächenstruktur der Nabelblutzellen grundsätzlich derjenigen von Erwachsenen-Erythrozyten entspricht. Der Unterschied in der Reaktion mit homologem Antiserum und Phyttagglutininen spricht dafür, daß gewisse Strukturen bei Erythrozyten von Neugeborenen durch Sialinsäure abgedeckt sind.

2. Freilegung eines Forssman-Antigens an der Oberfläche von Hühner-Erythrozyten.

Wie bereits bekannt, ist ein Forssman-Antigen (F.Ag.) an der Membranstruktur von Erythrozyten verschiedener Spezies beteiligt. Es scheint aber insofern von anderen

Tabelle 8

Agglutination von NDV-behandeltem und nicht-behandeltem Menschen-Nabelblut mit Phyttagglutinin.

N = nicht-behandelt; NDV = NDV-behandelt

Erythrozyten der Blutgruppe																								
A										O						AB				B				
1		2		3		4		5		1		2		3		4		1		2		1		
N	NDV	N	NDV	N	NDV	N	NDV	N	NDV	N	NDV	N	NDV	N	NDV	N	NDV	N	NDV	N	NDV	N	NDV	
A ₂ (Labor-num)	4	512	4	512	<2	512	<2	128	<2	256	<2	512	4	512	4	512	4	512	4	1024	<2	128	<2	256
A ₁ (Dolichos)	<2	<2	<2	<2	<2	4	<2	3	<2	6	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	
Lotus	4	1024	4	1024	<2	256	<2	128	<2	128	3	1024	4	1024	4	512	4	384	4	1024	<2	128	<2	384
Ulex	3	16	3	16	<2	16	<2	12	<2	12	3	16	7	32	7	64	3	32	7	32	<2	16	<2	58
Marasmius	<2	64	<2	64	<2	128	<2	128	<2	64	<2	256	4	58	3	24	<2	16	4	58	<2	8	<2	58
Sophora	<2	16	<2	16	<2	64	<2	256	<2	64	<2	32	<2	512	<2	<2	<2	<2	<2	512	<2	128	16	1024
Polyporus	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	16	32	16	32	16	128

Komponenten verdeckt zu werden, als es sich bei nativen Erythrozyten nicht immer nachweisen läßt. Im folgenden wurde versucht, das F.Ag. an der Oberfläche von Hühner-Erythrozyten mit Hilfe von NDV bzw. RDE freizulegen. Hierzu wurden Hühner-Erythrozyten mit Hilfe von NDV bzw. RDE, wie bereits beschrieben, bei 37° C behandelt und anschließend mit steigenden Verdünnungen eines F.Ag.-Antiserums gemischt.

Wie Tabelle 9 ausweist, werden die behandelten Erythrozyten durch relativ hohe F.Ag.-Antiserum-Verdünnungen agglutiniert. Dieses Resultat zeigt, daß nach RDE- bzw. NDV-Behandlung an der Oberfläche der Hühner-Erythrozyten ein Rezeptor auftritt, der mit F.Ag.-Antiserum zu reagieren vermag, in nichtbehandelten Blutzellen aber nicht nachzuweisen war. Durch Sialinsäure-Abspaltung wird an der Zelloberfläche daher offensichtlich ein F.Ag. freigelegt. Das Ergebnis wurde dadurch gesichert, daß die Hämolyse von Hammelblutzellen durch Hämolytischen Ambozeptor (Anti-Hammelerythrozyten-Kaninchenserum) bzw. F.Ag.-Antiserum in Anwesenheit von Komplement durch Absorption mit RDE bzw. NDV-behandelten Erythrozyten verhindert werden konnte. Die Unterschiede in der Reaktion von Hämolytischem Ambozeptor und F.Ag.-Antiserum (Tab. 10) können auf die Anwesenheit von Antikörpern im Ambozeptor zurückgeführt werden, die mit weiteren nicht genauer analysierten Antigenen der Hammel-Erythrozyten reagieren.

Absorptions-Analysen erbrachten schließlich den endgültigen Nachweis über die Natur des freigelegten Rezeptors. Wie aus Tabelle 10 ersichtlich, können die mit behandelten Hühner-Erythrozyten reagierenden Agglutinine im Hämolytischen Ambozeptor bzw. F.Ag.-Antiserum nicht mit gekochten Rinder- (M- und SK-Antigen) und gekochten Kaninchen-Erythrozyten (SK-Antigen), wohl aber mit nativen Schaf-Erythrozyten und Meerschweinchen-Nierenzellen

Tabelle 9

Nachweis von Forssman-Antigen an Neuraminidase-behandelten Hühner-Erythrozyten.
 Angegeben sind jeweils die reziproken HA-Titer.

Behandlung der Erythrozyten mit:	Hämolyt. Ambozeptor	Forssman- Antiserum	Normales Kaninchen-Serum
nicht behandelt	< 2	< 2	< 2
RDE	500	500	< 2
NDV	4000	4000	< 2

Tabelle 10

Absättigungsversuche zum Nachweis des Forssman-Antigens an Neuraminidase-behandelten Erythrozyten.

Antiserum	Erythrozyten u. Reaktion	Kontrolle	Antiserum abgesättigt mit			Forssman- Antigen
			Rindererythr. (100° C)	Kanincheneryth. (100° C)	Hammeleryth. (nativ)	
Hämolyt. Ambozeptor	NDV-Hühner Hämagl.	2000	2000	2000	< 20	< 20
	Normale Hammel Hämagl.	2000	1000	1000	< 20	2000
	Normale Hammel Hämolyse	4000	2000	4000	< 20	128
Forssman- Antiserum	NDV-Hühner Hämagl.	2000	2000	1000	< 20	< 20
	Normale Hammel Hämagl.	128	128	128	< 20	< 20
	Normale Hammel Hämolyse	2000	2000	2000	< 20	< 20

(F.Ag.) absorbiert werden (vergl. Schmidt, 1955). Bei dem freigelegten Rezeptor handelt es sich daher zweifellos um das Forssman-Antigen.

Die Hämagglutinationsreaktion mit F.Ag.-Antiserum ließ sich nicht durch normale, jedoch signifikant durch RDE- bzw. Aceton-behandelte Hühner-Erythrozyten inhibieren. Diese Befunde dienen als weitere Beweise dafür, daß durch Neuraminidase-Einwirkung ein bei normalen Hühner-Erythrozyten zwar vorkommendes, aber abgedecktes F.Ag. freigelegt wird.

3. Reaktion von nativen und Neuraminidase-behandelten Erythrozyten mit Normalseren von Mensch und Tier.

Das von Thomsen und Friedenreich gefundene Phänomen der Panagglutinabilität wurde von Burnet auf die Abspaltung von Sialinsäure durch Bakterien- oder Virus-Neuraminidase von der Erythrozyten-Oberfläche zurückgeführt. Zum Nachweis dieser Panagglutinabilität werden Neuraminidase-behandelte Erythrozyten mit normalen Menschenseren gemischt. Die Freilegung des T-Agglutinogens dokumentiert sich in einer auftretenden Agglutination der Erythrozyten. Die entsprechenden Agglutinine in normalen Menschenseren werden als T-Agglutinine bezeichnet. Im folgenden wurde untersucht, ob auch in normalen Tierseren vergleichbare Agglutinine vorhanden sind. Geprüft wurden Seren vom Huhn, Rind, Pferd, Schaf, Hund, Kaninchen, Schwein und Ratte gegen normale und Neuraminidase-behandelte Erythrozyten des Menschen.

Wie aus Tabelle 11 hervorgeht, reagieren alle untersuchten, nicht inaktivierten Tierseren mehr oder weniger stark mit normalen Menschen-Erythrozyten aller drei Blutgruppen. Nach Behandlung der Erythrozyten mit NDV steigt

Tabelle 11

Agglutination von nativen und NDV-behandelten Menschen-
Erythrozyten mit Menschen- und Tierseren

Serum	Erythrozyten der Blutgruppe					
	A		B		0	
	nicht-behandelt	NDV-behandelt	nicht-behandelt	NDV-behandelt	nicht-behandelt	NDV-behandelt
Menschen-Anti-B	< 2	4	32	64	< 2	4
Menschen-Anti-A	64	64	< 2	4	< 2	4
Menschen-Anti-AB	8	16	128	256	< 2	32
Huhn	16	64	8	64	16	64
Rind	12	256	12	128	16	128
Pferd	7	1024	12	1024	32	1024
Hammel	4	768	4	256	6	512
Hund	6	512	12	256	7	256
Schwein	64	768	16	128	8	128
Kaninchen	2	128	2	128	< 2	96
Ratte	< 2	4	< 2	4	< 2	4

der Agglutinationstiter gegen alle geprüften Seren signifikant an, d.h. daß in allen diesen Seren Komponenten vorhanden sind, die definitionsgemäß als T-Agglutinine bezeichnet werden können.

Nach diesen Befunden war es interessant zu prüfen, ob auf der Oberfläche von Erythrozyten der untersuchten Tiere wie bei Menschen-Erythrozyten ein T-Agglutinogen nach Einwirkung von Neuraminidase freigelegt wird.

Die in Tabelle 12 zusammengefaßten Versuchsergebnisse zeigen, daß sich generell zwei Arten von Reaktionen unterscheiden lassen: 1. Erythrozyten, die schon im nativen Zustand mit einigen Seren reagieren und 2. Erythrozyten, die erst nach Behandlung eine deutliche Reaktion mit den geprüften Seren geben. Neuraminidase-behandelte Erythrozyten vom Huhn, Hammel, Hund und Kaninchen lassen einen mehr oder weniger deutlichen Titeranstieg gegenüber nichtbehandelten Blutzellen erkennen, wenn sie mit Menschen-Seren getestet werden. Diese Befunde geben einen Hinweis dafür, daß auch in Tier-Erythrozyten T-Agglutinogene vorkommen. Bei Erythrozyten vom Pferd und Rind scheint dagegen dieses Agglutinogen nicht vorzukommen. Auffallend war bei diesen Untersuchungen weiterhin, daß nicht alle behandelten Tier-Erythrozyten mit dem homologen Serum reagierten.

Die durchgeführten Untersuchungen lassen bis jetzt noch keinen Schluß darüber zu, welche Art von Antigenen für die Panagglutinabilität durch die Neuraminidase-Behandlung auf der Erythrozyten-Oberfläche freigelegt werden und für die entsprechende Reaktion verantwortlich sind. Wie bereits gezeigt, lassen sich die hervorgerufenen Veränderungen viel exakter mit Hilfe von Phyttagglutininen erfassen, welche nur mit gewissen Kohlenhydraten spezifisch reagieren. Es ist jedoch anzunehmen, daß die in

Tabelle 12

Agglutination von nativen und NDV-behandelten Tier-Erythrozyten
mit Seren von Menschen und verschiedenen Tierarten

N = nicht-behandelt; NDV = NDV-behandelt

Serum	Erythrozyten vom											
	Huhn		Rind		Pferd		Hammel		Hund		Kaninchen	
	N	NDV	N	NDV	N	NDV	N	NDV	N	NDV	N	NDV
Menschen-Anti-B	< 2	4	< 2	2	8	8	< 2	4	64	128	128	256
Menschen-Anti-A	< 2	4	< 2	2	4	7	2	4	58	128	128	512
Menschen-Anti-AB	< 2	16	< 2	2	58	128	2	32	58	512	256	1024
Huhn	< 2	2	< 2	3	4	8	6	32	256	512	512	1024
Rind	12	58	< 2	2	3	3	3	24	12	58	58	96
Pferd	< 2	12	< 2	2	< 2	< 2	< 2	12	2	96	2	12
Hammel	3	12	< 2	2	16	16	< 2	6	< 2	256	32	128
Hund	3	6	2	2	32	32	3	8	< 2	2	32	64
Schwein	2	4	2	< 2	3	3	8	8	2	4	12	58
Kaninchen	< 2	2	2	< 2	< 2	< 2	< 2	4	< 2	16	< 2	< 2

dieser Arbeit nachgewiesenen freigelegten Kohlenhydrate für die Panagglutinabilität mitverantwortlich gemacht werden können.

B. Nicht enzymatisch bedingte Veränderungen an der Erythrozyten-Oberfläche nach NDV-Behandlung

1. Nachweis von Forssman-Antigen im NDV

Wie die in Tabelle 13 zusammengestellten Versuchsergebnisse zeigen, lassen sich die im F.Ag.-Antiserum enthaltenen Agglutinine gegen NDV- und RDE-behandelte Hühner-Erythrozyten auch durch gereinigtes, natives bzw. auf 100° C erhitztes NDV-Konzentrat absättigen. Bei dem Versuch wurden 0,5 ml Ambozeptor bzw. F.Ag.-Antiserum mit 0,5 ml nativem bzw. erhitztem NDV-Konzentrat (HA-Titer: 1 : 16 000) gemischt, 2 Stunden bei Raumtemperatur gehalten und anschließend bei ρ_i 12,5 zentrifugiert. Die abgesättigten Seren wurden gegen Hühner- und Hammel-Erythrozyten im Agglutinationsversuch getestet.

Die Versuchsergebnisse besagen, daß im NDV ein Antigen vorhanden ist, das auf Grund der bereits gewonnenen Befunde, F.Ag.-Charakter besitzt. Dafür sprechen auch die in Tabelle 13 weiterhin aufgeführten Ergebnisse von Absättigungsversuchen, die zeigen, daß die in Gegenwart von Komplement und F-Antiserum bei Hammel-Erythrozyten auftretende Hämolyse durch gekochtes NDV-Konzentrat aufgehoben werden kann.

Um die Frage zu prüfen, ob das im NDV nachgewiesene F.Ag. ein Teil der normalen Wirtskomponente ist, wurde ein in Enteneiern (die wie die Hausente kein F.Ag. besitzen) ge-

Tabelle 13

Nachweis von Forssman-Antigen im NDV

HA = Hämagglutination

HL = Hämolyse

Reaktion	Erythrozyten Spezies	Erythrozyten behandelt mit	Forssman-Antiserum			
			nicht abgesättigt	abgesättigt mit Hühner-NDV (nativ)	abgesättigt mit Hühner-NDV (100° C)	abgesättigt mit Enten-NDV
HA	Huhn	RDE	250	< 2	< 2	250
		NDV (Huhn)	3000	< 20	< 20	3000
HA	Hammel	nicht	128	< 2	< 2	128
HL		nicht	2000	< 2	< 20	2000

züchtetes Virus (Enten-NDV) isoliert und für einen Absättigungsversuch benutzt. Dieser Versuch wurde entsprechend dem oben beschriebenen mit nativem Virus durchgeführt. Wie aus Tabelle 13 hervorgeht, wird das gegen F.Ag. gerichtete Agglutinin im F.Ag.-Antiserum nur durch NDV, das im Hühnerei gezüchtet wurde (Hühner-NDV), nicht dagegen durch Enten-NDV absorbiert. Enten-NDV enthält danach kein F.Ag., d.h. die Bildung des im Hühner-NDV vorkommenden Forssman-Antigens wird nicht durch das genetische Material des Virus gekodet, sondern aller Wahrscheinlichkeit nach als "Normale Komponente" beim Zusammenbau der Viruspartikel von der Wirtszelle übernommen.

2. Übertragung eines Forssman-Antigens vom NDV auf Hühner-Erythrozyten.

Da, wie gezeigt wurde, das NDV selbst Träger eines F.Ag. ist, war es nicht ausgeschlossen, daß mit dem Virus ein Forssman-Antigen auf die Erythrozyten-Oberfläche übertragen werden kann, das wie der durch Neuraminidase freigelegte F.Ag.-Rezeptor mit F.Ag.-Antiserum bzw. Hämolytischem Ambozeptor zu reagieren vermag. Wir versuchten diese Frage mit Hilfe von Enten-Erythrozyten zu klären, bei denen durch RDE-Behandlung kein F.Ag. freigelegt werden konnte. Entenblutzellen wurden hierfür nach den bereits beschriebenen Bedingungen sowohl mit Hühner-NDV als auch mit F.Ag.-freiem Enten-NDV behandelt.

Wie Tabelle 14 ausweist, werden nur solche Enten-Erythrozyten durch F-Antiserum bzw. Hämolytischen Ambozeptor agglutiniert, die mit F.Ag.-haltigem Hühner-NDV nicht dagegen solche, die mit Enten-NDV behandelt worden waren. Daß Enten-NDV an Enten-Erythrozyten absorbiert wird, geht daraus hervor, daß die entsprechend behandelten Blutzellen wie Hühner-NDV-behandelte Hühner-Erythrozyten durch

Tabelle 14

Herkunft des Forssman-Antigens

Erythrozyten Spezies	Erythrozyten behandelt mit	Hämagglutination mit	
		Forssman- Antiserum	NDV-Antiserum
Huhn	nicht	< 2	< 2
	RDE	500	4
	NDV (Huhn)	1000	1000
	NDV (Ente)	500	1000
Ente	nicht	< 2	4
	RDE	< 2	16
	NDV (Huhn)	2000	8000
	NDV (Ente)	20	8000

NDV-Antiserum agglutiniert werden. Andererseits reagieren aber Hühnerblutzellen mit Forssman-Antikörpern, gleichgültig ob sie mit RDE, Enten- oder Hühner-NDV behandelt worden waren. Die Versuchsergebnisse besagen, daß das durch NDV-Behandlung erfaßbare F.Ag. sowohl durch Einwirkung der Neuraminidase an der Erythrozyten-Oberfläche freigelegt als auch vom Hühner-NDV auf diese übertragen werden kann.

3. Auftreten eines Mononukleose-Antigens an der Oberfläche NDV-behandelter Erythrozyten.

Von Anderson (1947) konnte gezeigt werden, daß NDV-behandelte Erythrozyten durch eine Reihe von Seren von Patienten agglutiniert werden, die an infektiöser Mononukleose erkrankt waren. Auf Grund der bei unseren Untersuchungen gewonnenen Erfahrungen war es nunmehr möglich, Aufschlüsse über diese Reaktion zu gewinnen. Da Mononukleose-Seren, die mit RDE-behandelten Hühner-Erythrozyten abgesättigt worden waren, mit NDV-Erythrozyten agglutinierten, ist anzunehmen, daß das Mononukleose-Antigen nicht durch Neuraminidase-Einwirkung freigelegt, sondern vielmehr vom Virus auf die Erythrozyten-Oberfläche übertragen wurde (vergl. Tab. 17). Daß das tatsächlich zutrifft, konnte weiterhin in Versuchen gezeigt werden, in denen Mononukleose-Serum mit nativem NDV-Konzentrat abgesättigt wurde. Wie Tabelle 15 zeigt, ließen sich die mit NDV behandelten Hühner-Erythrozyten reagierenden Agglutinine im Mononukleose-Serum durch NDV quantitativ entfernen.

Aufschlüsse über die Natur des mit Mononukleose-Serum reagierenden Antigens an NDV-behandelten Erythrozyten wurden durch folgende Absättigungsversuche gewonnen: Mononukleose-Serum wurde mit Meerschweinchen-Nierengewebe

Tabelle 15

Absättigungsversuche zum Nachweis des Mononukleose-Antigens
 Angegeben sind die reziproken HA-Titer

Erythrozyten	Kontrolle	NDV 100° C	Mononukleose-Serum abgesetzt mit			Kaninchenerythr. (100° C)
			Rindererythr. (100° C)	Hammelerythr. (nativ)	Forssman- Antigen	
Serum I.	NDV-Huhn	< 2	8	128	128	128
	Tryps. Rinder	128	< 2	64	1000	1000
	Normale Hammel	128	32	< 2	128	128
Serum II.	NDV-Huhn	32	32	-	1000	1000
	Tryps. Rinder	128	16	-	1000	1000
	Normale Hammel	-	-	-	-	-

(F.Ag.), gekochten Rinder-(Mononukleose- und Serumkrankheit-Antigen) bzw. Kaninchen-Erythrozyten (Serumkrankheit-Antigen) oder nativen Hammelblutzellen behandelt. Wie aus den entsprechenden Versuchen hervorgeht (vergl. Tab. 15), läßt sich die Agglutinationsreaktion mit NDV-behandelten Hühner-Erythrozyten und Mononukleose-Serum weder mit gekochten Kaninchen- bzw. nativen Hammel-Erythrozyten, noch mit Meerschweinchen-Nierengewebe, wohl aber mit gekochten Rinder-Erythrozyten bzw. gekochtem NDV-Konzentrat absorbieren. Das bedeutet, daß durch das NDV ein mit Mononukleose-Serum reagierendes Antigen auf die Erythrozyten-Oberfläche übertragen wurde, das mit dem Mononukleose-Antigen der Hammel-Erythrozyten nicht identisch ist (vergl. Tab. 17). Im Mononukleose-Serum müssen daher verschiedene Mononukleose-Antikörper enthalten sein, nämlich ein Antikörper, der sowohl mit NDV-behandelten Hühner-Erythrozyten (MV) als auch mit Rinder-Erythrozyten (MR) und ein zweiter (MH), der mit Hammel-Erythrozyten reagiert. Betrachtet man die in Tabelle 15 weiterhin angeführten Daten mit trypsinierten Rinder- und nativen Hammel-Erythrozyten, so kommt dieser Unterschied ganz klar zum Ausdruck.

Ein weiterer Beweis dafür, daß im Mononukleose-Serum verschiedene Antikörper vorhanden sind, wurde in einem Versuch erbracht, bei dem ein Patienten-Serum benutzt wurde, das Hammel-Erythrozyten nicht, wohl aber trypsinierte Rinder- und NDV-behandelte Hühner-Erythrozyten agglutinierte. Absorptionsanalysen ergaben, daß das entsprechende Agglutinin (Serum II) eine Antigengemeinschaft mit dem MR-Antikörper besitzt (Tab. 15).

Daß auch ein Unterschied in der Struktur zwischen MR- bzw. MV- und MH-Antigen besteht, geht aus einem Versuch hervor, bei dem native Hammel- und trypsinierte Rinder-

Erythrozyten nach einer zweistündigen RDE-Behandlung bei 37° C mit Mononukleose-Serum getestet wurden. Wie Tabelle 16 zeigt, wird zwar das MH-, nicht aber das MR- und MV-Antigen durch RDE zerstört. Das bedeutet, daß Sialinsäure für die "Mononukleose-Spezifität" der Hammel-Erythrozyten, nicht dagegen für die der Rinder- und NDV-behandelten Hühner-Erythrozyten notwendig ist.

Die in Tabelle 15 aufgeführten Absättigungsversuche deuten aber darauf hin, daß auch zwischen MV und MR gewisse Unterschiede in der Antigenstruktur bestehen. Bei der Untersuchung einer größeren Anzahl von Mononukleose-Seren konnte darüber hinaus nicht immer eine Parallelität in der Titerhöhe gegen NDV-behandelte Hühner- und trypsinierte Rinder-Erythrozyten gefunden werden.

4. Wirtsspezifische Komponente als Träger des Mononukleose-Antigens im NDV.

Wie beim Forssman-Antigen wurde auch beim Mononukleose-Antigen des NDV geprüft, ob dessen Synthese durch das Virus-Genom determiniert wird. Hierfür benutzten wir das vorne bereits beschriebene System des NDV, das in Enten- bzw. in Hühnereiern gezüchtet wurde.

Wie ein Vergleich zeigt, (Tab. 17) läßt sich das MV-Antigen nur an solchen Hühner-Erythrozyten nachweisen, die mit Hühner-NDV, nicht dagegen an solchen, die mit Enten-NDV behandelt waren. Auch reagierten mit Mononukleose-Serum nur diejenigen Enten-Erythrozyten, die mit Hühner-NDV inkubiert worden waren, obwohl auch Enten-NDV sowohl an Enten- als auch an Hühner-Erythrozyten irreversibel adsorbiert wurde, wie entsprechende Versuche mit NDV-Antiserum zeigten. Wie beim Forssman-Antigen handelt es sich demnach beim MV-Antigen um eine wirtsspezifische Komponente des NDV.

Tabelle 16

Hämagglutination von Mononukleose-Serum
mit nativen und RDE-behandelten Erythrozyten.

Erythrozyten	Erythrozyten	
	nicht behandelt	RDE-behandelt
Normal Hammel	128	4
NDV-Hühner	128	128
Trypsin. Rinder	1000	1000

Tabelle 17

Herkunft des Mononukleose-Antigens

Erythrozyten Spezies	Erythrozyten behandelt mit	Reaktion mit	
		Mononukleose- Serum	NDV-Antiserum
Huhn	nicht	< 2	< 2
	RDE	8	4
	NDV (Huhn)	1000	1000
	NDV (Ente)	8	1000
Ente	nicht	< 2	4
	RDE	8	16
	NDV (Huhn)	8000	8000
	NDV (Ente)	8	8000

VI. Besprechung der Ergebnisse

Neben den bereits bekannten und in der Einleitung beschriebenen durch das NDV hervorgerufenen Veränderungen an der Erythrozyten-Oberfläche, wurde in dieser Arbeit gefunden, daß das NDV auf zweierlei Art die Oberflächenstruktur von roten Blutkörperchen beeinflussen kann. Einerseits wird die Änderung bedingt, durch Einwirkung der im NDV vorhandenen Neuraminidase, andererseits durch Übertragung von Virus-Antigen auf die Erythrozyten-Oberfläche.

Die beschriebenen Versuchsergebnisse lassen keinen Zweifel darüber bestehen, daß durch Einwirkung von NDV-Neuraminidase an der Erythrozyten-Oberfläche Kohlenhydrate freigelegt werden, die an der ABH-Blutgruppen-Spezifität beteiligt sind. Diese Kohlenhydrate entsprechen nicht nur denjenigen, die vor der Enzym-Behandlung die Spezifität der ABH-Antigene determiniert haben, sondern es lassen sich auch solche erfassen, die bei normalen Zellen nicht nachweisbar waren.

Eindeutig wurde mit Hilfe der Phyttagglutinine aus *Ulex europaeus*, *Lotus tetragonolobus* und *Laburnum alpinum* gezeigt, daß bei allen verwendeten NDV-behandelten Menschen-Erythrozyten H-Rezeptoren freigelegt wurden. Dieser Befund wird dadurch gestützt, daß sich die Reaktion mit *Ulex* bzw. *Lotus* durch L-Fucose und die mit *Laburnum alpinum* durch D-Salicin hemmen ließ.

Nach Watkins und Morgan (1962) sowie Rege et al. (1964), besitzen Erythrozyten der Blutgruppe O zwei Arten von Rezeptoren, deren determinierende Kohlenhydrate L-Fucose und N-Acetyl-D-Glucosamin sind. Der Fucose-haltige Rezeptor wird durch Phyttagglutinin aus *Lotus tetragonolobus* erfaßt, da sich die entsprechende Reaktion durch L-Fucose, nicht dagegen durch D-Salicin bzw. durch N,N'-Diace-

tyl-Chitobiose hemmen läßt. Der N-Acetyl-D-Glucosaminhaltige Rezeptor wird dagegen durch Laburnum-Extrakt nachgewiesen, denn diese Reaktion läßt sich im Gegensatz zu der mit Lotus durch D-Salicin und N,N'-Diacetyl-Chitobiose inhibieren. Durch Ulex europaeus können aber offensichtlich beide Blutgruppen-H-Rezeptoren erfaßt werden.

Bei unseren Versuchen konnte darüber hinaus festgestellt werden, daß behandelte Erythrozyten mit Ulex bzw. Lotus und Laburnum unterschiedlich stark reagieren. Das könnte bedeuten, daß die beiden H-Rezeptoren nicht miteinander gekoppelt sind. Dafür sprechen auch unsere Untersuchungen mit Hühner-Erythrozyten bei denen nach NDV-Behandlung nur ein Laburnum- nicht dagegen ein Lotus-Rezeptor nachzuweisen war.

Ein ähnliches Bild ergab sich bei Verwendung der B-spezifischen Phyttagglutinine aus Polyporus fomentarius, Sophora japonica und Marasmius oreades. Hier wurden durch die Neuraminidase-Einwirkung bei allen getesteten Menschen-Erythrozyten der Blutgruppen A, B und O Rezeptoren frei, die mit diesen Anti-B-Phyttagglutininen reagierten. Die Befunde berechtigten zunächst zu der Annahme, daß an allen Erythrozyten D-Galaktose freigesetzt wurde. Die Agglutinationen der behandelten Erythrozyten mit Polyporus und Sophora ließen sich allerdings sowohl durch D-Galaktose als auch durch N-Acetyl-D-Galaktosamin hemmen. Diese Phyttagglutinine erfassen bei ihrer Reaktion mit determinierenden Kohlenhydraten wahrscheinlich nur kleinere Molekülbezirke, die D-Galaktose und N-Acetyl-D-Galaktosamin gemeinsam haben, so daß dadurch ein sicherer Nachweis nicht erbracht werden konnte, ob bei Erythrozyten der Blutgruppe A D-Galaktose oder N-Acetyl-D-Galaktosamin entstanden sind.

Im Gegensatz zu den bisher erfaßten B- und H-Rezeptoren, welche bei allen Blutgruppen durch Neuraminidase freigelegt werden können, wurde die Freisetzung des A-Rezeptors ausschließlich bei Erythrozyten der Blutgruppe A beobachtet. Das ergibt sich vor allem aus den Agglutinationen mit den streng A-Blutgruppen-spezifischen Phyttagglutininen aus *Dolichos biflorus* und *Phaseolus limensis*. Hier konnte nur bei der Blutgruppe A ein deutlicher Titeranstieg beobachtet werden, der sich allein durch N-Acetyl-D-Galaktosamin hemmen ließ. Bei *Vicia cracca* war zwar ein Titeranstieg bei allen behandelten Menschen-Erythrozyten festzustellen, eine Hemmung mit N-Acetyl-D-Galaktosamin gelang jedoch nur bei A-Erythrozyten. Bemerkenswert ist, daß bei den untersuchten tierischen Erythrozyten in keinem Falle eine Reaktion mit *Dolichos* und *Phaseolus* beobachtet wurde.

Überraschenderweise konnten die freigelegten, durch Phyttagglutinine erfaßbaren blutgruppenspezifischen Rezeptoren nicht mit Hilfe von Immunseren nachgewiesen werden. Durch Anwendung des Coombs-Testes konnte ausgeschlossen werden, daß die Reaktion aus sterischen Gründen nicht eingetreten ist. Der Coombs-Test erfaßt im Gegensatz zur einfachen Agglutinationsreaktion auch sogenannte inkomplette Reaktionskomponenten. Zwar konnte mit dem Coombs-Test ein Titeranstieg nach NDV-Behandlung nachgewiesen werden, der aber insofern nicht blutgruppenspezifisch war, da er nicht durch ABH-Substanz gehemmt werden konnte. Die Diskrepanz zwischen den durch Phyttagglutinin und Immunseren erhaltenen Befunde lassen sich durch die Annahme erklären, daß die Sialinsäure nicht die blutgruppenspezifischen Antigene blockiert, sondern an andere Kohlenhydrate der Erythrozyten-Oberfläche gebunden ist. Daß es Fälle gibt, in denen die Sialinsäure auch an der Struktur der blutgruppenspezifischen Antigene beteiligt ist, zeigen die Beobachtungen bei den Unter-

suchungen an Neugeborenen-Blut, welches nach NDV-Behandlung einen Titeranstieg sowohl gegenüber Phyttagglutinin als auch gegenüber ABH-spezifischen Antiseren ergab. Diese Feststellungen mahnen zur Vorsicht bei Verwendung von Phyttagglutininen zur Blutgruppen-Diagnostik, besonders in Fällen, bei denen eine Veränderung der Erythrozyten-Oberfläche durch pathologische Prozesse zu erwarten ist.

Neben blutgruppenspezifischen Kohlenhydraten konnte bei NDV-behandelten Erythrozyten des Huhnes auch ein mit nativen Erythrozyten nicht nachweisbares Forssman- und ein Mononukleose-Antigen erfaßt werden. Durch Ab-sättigungsversuche konnten andere Antigene, die die Reaktion beeinflussen könnten, eindeutig ausgeschlossen werden.

Das Forssman-Antigen kann, wie Versuche mit *Vibrio cholerae* Neuraminidase (RDE) zeigen, durch Abspaltung von Sialinsäure an der Erythrozyten-Oberfläche freigelegt werden. Außerdem läßt es sich aber auch von dem NDV auf diese übertragen. Das geht aus Versuchen hervor, bei denen als Test-System Entenblutzellen verwendet wurden, die kein Forssman-Antigen enthalten und daher nach RDE-Einwirkung weder mit Anti-Hammelerythrozyten-Serum noch mit einem Forssman-Antigen-Antiserum reagierten. Sie wurden durch diese Antiseren jedoch agglutiniert, wenn sie mit NDV inkubiert worden waren, das im Hühner-ei gezüchtet wurde. Auch ließ sich das mit NDV-behandelten Enten-Erythrozyten reagierende Agglutinin im Forssman-Antigen-Antiserum mit nativem und gekochtem Hühner-NDV adsorbieren. Dadurch wurde bewiesen, daß das NDV Forssman-Antigen enthält.

Das Mononukleose-Antigen muß dagegen ausschließlich vom Virus auf die Erythrozyten-Oberfläche übertragen werden, da es nicht durch RDE auf dieser freigelegt werden kann.

Daß ein solches Antigen tatsächlich am NDV lokalisiert ist, ergaben entsprechende Absättigungsversuche mit nativen und auf 100° C erhitzten, gereinigten NDV-Konzentraten.

Wie nach Absorptionsanalysen festgestellt wurde, scheint das Mononukleose-Antigen des NDV (MV) mit dem der Rinder-Erythrozyten (MR) verwandt zu sein. Es unterscheidet sich jedoch offensichtlich von dem sogenannten Mononukleose-Antigen der Hammel-Erythrozyten (MH), was auch aus Untersuchungen von Anderson (1947) hervorgeht. Am klarsten traten diese Unterschiede bei Verwendung eines Patienten-Serums zutage, das keine Agglutinine gegenüber Hammel-Erythrozyten enthielt, das jedoch trypsinierte Rinder- und NDV-behandelte Hühnerblutzellen zu agglutinieren vermochte. Neben diesem Extrem enthielten die meisten der untersuchten Mononukleose-Seren unterschiedliche Anteile von MV-, MR bzw. MH-Antikörpern. Es ist daher auch verständlich, daß nicht alle Mononukleose-Seren mit NDV-behandelten Erythrozyten reagieren.

Die biologischen Unterschiede der beiden Mononukleose-Antigene (MR bzw. MV und MH) konnten auch durch enzymchemische Untersuchungen verifiziert werden. Während der MH-Rezeptor, wie bereits Springer zeigte (1957, 1965), durch RDE-Behandlung zerstört wird, erwiesen sich die MV- und MR-Antigene Neuraminidase-resistent. Es wäre interessant zu prüfen, ob ein ursächlicher Zusammenhang zwischen dem Auftreten von MR-, MV- oder MH-Antikörpern und dem klinischen Bild der Mononukleose besteht.

Auf Grund der durchgeführten Untersuchungen sind sowohl das Forssman-Antigen als auch das Mononukleose-Antigen Bestandteile der normalen Wirtskomponente des NDV. Die Hämagglutination von NDV-behandelten Erythrozyten mit

Mononukleose-Serum scheint demnach auf einer Reaktion mit Auto-Antikörpern zu beruhen. Es ist besonders interessant, daß sich beide Antigene nicht nachweisen lassen, wenn das NDV aus Enteneiern isoliert wird. Inwieweit Zusammenhänge zwischen dem Auftreten beider Antigene bestehen, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Es ist möglich, daß das Forssman-Antigen und das MV-Antigen ähnliche Strukturen besitzen, die von den Zellen der Hausente nicht synthetisiert werden können.

Auf Grund der bisher erhaltenen Versuchsergebnisse läßt sich folgendes Bild von der Wechselwirkung zwischen NDV und Erythrozyten aufstellen: Die Neuraminidase spaltet von der Erythrozyten-Oberfläche Sialinsäure ab. Dadurch werden bestimmte Kohlenhydrate freigelegt, die vorher nicht endständig waren, und zwar bei allen drei untersuchten Blutgruppen: D-Galaktose, L-Fucose und N-Acetyl-D-Glucosamin; N-Acetyl-D-Galaktosamin erscheint dagegen nur nach NDV-Einwirkung bei Erythrozyten der Blutgruppe A. Sialinsäure ist bei Erythrozyten von erwachsenen Menschen nicht an die blutgruppenspezifischen Antigene gebunden. Sie kann aber (Hühner-Erythrozyten) an andere kohlenhydrathaltige Strukturen gebunden sein, die nach ihrer Abspaltung antigene Eigenschaften annehmen. Das könnte bedeuten, daß die Sialinsäure eine wesentliche Funktion bei der Antigen-Spezifität zu erfüllen hat. Neben den enzymatisch bedingten Veränderungen der Erythrozyten-Oberfläche besitzen NDV-behandelte Erythrozyten noch Eigenschaften, die auf eine irreversible Bindung von NDV zurückzuführen sind. Dadurch werden Antigene auf Erythrozyten nachgewiesen, die vom Virus stammen.

Es wäre interessant zu prüfen, ob die in vitro gefundenen Veränderungen auf Erythrozyten auch in vivo auftreten und inwieweit sie für die Pathogenität des NDV verantwortlich gemacht werden können.

VII. Zusammenfassung

In vitro vermag das Newcastle disease Virus die Erythrozyten-Oberfläche sowohl durch Abspaltung von Sialinsäure als auch durch irreversible Anlagerung von Virusmaterial zu verändern.

Neben den bereits bekannten Veränderungen wurde gefunden, daß durch Einwirkung von Virus-Neuraminidase an der Erythrozyten-Oberfläche Kohlenhydrate freigelegt werden, die an der ABH-Blutgruppenspezifität beteiligt sind. Sie entsprechen nicht nur denjenigen, die vor der Sialinsäure-Abspaltung die Blutgruppenspezifität bestimmt haben, sondern es lassen sich mit Hilfe von Phyt-agglutininen auch solche Kohlenhydrate erfassen, die bei normalen Zellen nicht nachzuweisen sind.

Darüber hinaus konnte an NDV-behandelten Erythrozyten ein Forssman- und ein Mononukleose-Antigen nachgewiesen werden. Das Forssman-Antigen kann entweder auf der Erythrozyten-Oberfläche durch Sialinsäure-Abspaltung freigelegt oder vom Virus auf diese übertragen werden. Das Mononukleose-Antigen wird dagegen ausschließlich vom NDV auf die Erythrozyten-Oberfläche übertragen. Beide Antigene, die im NDV nachgewiesen werden konnten, ließen sich als Bestandteile der Normal-Komponente des Virus identifizieren. Das Mononukleose-Antigen des NDV unterscheidet sich deutlich von demjenigen der Hammel-Erythrozyten, scheint jedoch in seiner Struktur gewisse Ähnlichkeit mit demjenigen der Rinder-Erythrozyten zu besitzen. Auf Grund der erhaltenen Befunde konnte die von Burnet und seiner Schule beschriebene Reaktion von NDV-behandelten Erythrozyten mit Mononukleose-Serum aufgeklärt werden.

Die Bedeutung der Untersuchungsergebnisse wird diskutiert.

VII. Literaturverzeichnis

1. Aminoff, D. (1961)
Methods for the quantitative estimation of N-acetyl-neuraminic acid and their application to hydrolysates of sialo mucoides.
Biochem. J. 81, 384 - 392
2. Andrewes, C.H., F.B. Bang, and F.M. Burnet (1955)
A short discription of the myxovirus group (influenza- and related viruses).
Virology 1, 176 - 184
3. Anderson, S.G. (1947)
The reaction between red cells and viruses of the influenza group. Studies with Newcastle disease virus.
Aust. J. Exp. Biol. Med. Science 25, 163 - 174
4. Anderson, S.G. (1959)
Hemagglutination by animal viruses, in:
"The Viruses", Band 3, p. 21 - 50.
Herausgegeben von F.M. Burnet und W.M. Stanley.
Academic Press New York und London
5. Burnet, F.M. (1960)
Principles of animal virology.
2. Auflage. Academic Press New York und London
6. Drzeniek, R. und R. Rott (1963)
Abspaltung einer Neuraminidase-haltigen Komponente aus Newcastle disease Virus.
Z. Naturforschg. 18b, 1127 - 1128
7. Friedenreich, V. (1930)
The Thomsen hemagglutination phenomenon.
Levin and Munksgaard Verlag Kopenhagen.

8. Gottschalk, A. (1959)
On the mechanism underlying initiation of influenza virus infection.
Ergeb. Mikrobiol. 32, 1 - 22
9. Krüpe, M. (1956)
Blutgruppenspezifische Pflanzliche Eiweißkörper
(Phytoagglutinine)
F. Enke Verlag Stuttgart
10. Krüpe, M. und A. Ensgraber (1962)
Der Beitrag der Phytohämagglutinine zum serologischen Spezifitätsproblem.
Z. Immunitätsforsch. exp. Therap. 123, 355 - 366
11. Morgan, W.T.J. (1964)
Human blood group specific substances.
15. Mosbacher Colloquium über Immunchemie.
Springer Verlag Berlin. im Druck
12. Munk, und W. Schäfer (1951)
Eigenschaften tierischer Virusarten untersucht an den Geflügelpestviren als Modell.
II. Serologische Untersuchungen über die Geflügelpestviren und über ihre Beziehungen zu einem normalen Wirtsprotein.
Z. Naturforschg. 6b, 372 - 379
13. Prokop, O. und G. Uhlenbruck (1963)
Lehrbuch der menschlichen Blut- und Serumgruppen.
Edition Leipzig
14. Rege, V.P., T.J. Painter, and W.M. Watkins (1964)
Isolation of serological active fucose containing oligosaccharides from human blood group H substance.
Nature 203, 360 - 363

15. Rott, R. (1964)
Antigenicity of Newcastle disease virus in:
Newcastle disease virus: An evolving pathogen
p. 135 - 145
Herausgegeben von R.P. Hanson. The University
of Wisconsin press
16. Rott, R. (1965)
Untersuchungen über die Feinstruktur des infek-
tiösen Partikels der Newcastle disease und über
die neben ihm auftretenden, nicht infektiösen
virusspezifischen Einheiten.
Zbl. Vet. Med. 12b, 74 -116
17. Rott, R. und G. Müller (1965)
Über den "toxischen Effekt" des Newcastle disease
Virus.
Arch. ges. Virusforschg. 18, 139 - 154
18. Rott, R. und C. Scholtissek (1964)
Einfluß von Actinomycin auf die Vermehrung der
Myxoviren.
Z. Naturforschg. 19b, 316 - 323
19. Schmidt, H. (1965)
Fortschritte der Serologie.
Verlag Dr. Dietrich Steinkopff Darmstadt
20. Tomcsik, J. (1961)
Die serologische Diagnostik der Mononucleosis
infectiosa.
Triangel 5, 114 - 120
21. Uhlenbruck, G. (1961)
Zur Definition der Panhaemagglutination unter
besonderer Berücksichtigung des Thomsen-Frie-
denreich'schen Phänomens.
Zbl. Bakteriол. (Ref.) 179, 229 - 250
22. Watkins, W.M und T.J. Morgan (1962)
Further observations on the inhibition of
bloodgroup specific serological reactions by
simple sugars of known structure.
Vox Sang. 7, 129-150

Ein Teil der Arbeit wurde bereits veröffentlicht:

Saber, M.S., R. Drzeniek und M. Krüpe (1965)

Veränderung der Erythrozyten-Oberfläche durch New-castle disease Virus.

I. Mitt. Freilegung von ABH-Blutgruppen determinierenden Kohlenhydraten an Erythrozyten durch Neuraminidase-Einwirkung.

Z. Naturforschg. 20b, 965 - 973

Herrn Professor Dr. R. Rott bin ich
für seine menschliche und wissen-
schaftliche Unterstützung zu großem
Dank verpflichtet.

Herrn Dr. R. Drzeniek danke ich für
seine vielseitige Hilfe, die er mir
jederzeit gewährte.

L e b e n s l a u f

Am 24. November 1936 wurde ich, Mohamed Sami Saber, als Sohn des Saber Mohamed und dessen Ehefrau Bahía Ragab in Kairo/V.A.R. geboren.

Von 1945 - 1949 besuchte ich in Kairo die Volksschule und ab 1949 die Staatliche Kehdivie Ismail Sekundärschule, an der ich im Jahre 1954 die Reifeprüfung ablegte.

Von Mai 1955 bis Juni 1960 studierte ich Veterinärmedizin an der Universität Kairo und schloß das Studium mit dem Grad eines Bakkalaureus der Veterinärmedizin (B.V.Sc.) mit der Gesamtnote "gut" ab.

Von Dezember 1960 bis Dezember 1961 arbeitete ich als wiss. Assistent in der Water Pollution Unit des National Research Center in Kairo. Von Dezember 1961 bis Februar 1963 war ich wiss. Assistent im Bakteriologischen Institut der Veterinärmedizinischen Fakultät in Kairo. Während dieser Zeit legte ich die Ergänzungsprüfung in Bakteriologie, Lebensmittelkunde und Hygiene mit der Gesamtnote "gut" ab.

Seit 1. März 1963 bin ich als Stipendiat der Universität Kairo in Deutschland, um mich in die Virusforschung einzuarbeiten. Zunächst war ich bis zum 30. April 1964 am Max-Planck-Institut für Virusforschung, Biologisch-Medizinische Abteilung (Prof. Dr. W. Schäfer), in Tübingen. Während dieser Zeit war ich 2 Monate lang Gast an der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Haustiere in Tübingen. Am 1. Mai 1964 ging ich mit Herrn Prof. Dr. Rott nach Gießen, um dort meine Doktorarbeit durchzuführen. Daneben bearbeitete ich sowohl in Tübingen als auch in Gießen Probleme über Struktur und Vermehrung der Myxoviren.

FOTO-DRUCK

H. Gahmig · Graph. Anstalt · 63 Gießen · Klinikstraße 21 · Telefon 78546

FOTO-DRUCK

H. Gahmig · Graph. Anstalt · 63 Gießen · Klinikstraße 21 · Telefon 78546